

**Untersuchungen zur Wirkung von  
Pentaerythryltetranitrat (PETN) auf die Dysfunktion  
von Endothelzellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät**

**der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Veronika Teichert

geboren am 11.07.1992 in Dresden

#### Gutachter

1. PD Dr. med. Tanja Groten, Jena
2. Prof. Dr. Regine Heller, Jena
3. PD Dr. rer. nat. Florian Herse, Berlin

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.11.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>3</b>
3.1	Plazenta und Plazentation .....	3
3.2	Störungen der Plazentation .....	5
3.2.1	Präeklampsie .....	7
3.2.2	Intrauterine Wachstumsretardierung.....	9
3.3	Therapie und Prophylaxe der Plazentationsstörungen .....	10
3.4	Aktuelle Forschung an Therapieoptionen .....	11
3.4.1	Pilotstudie zur Therapie der Präeklampsie und der intrauterinen Wachstumsretardierung mit Pentaerythryltetranitrat .....	11
3.4.2	Der NO-Donor Pentaerythryltetranitrat.....	12
3.5	Endotheliale Dysfunktion <i>in vitro</i> .....	13
3.5.1	Induktion der endothelialen Dysfunktion <i>in vitro</i> .....	14
3.5.2	Nachweis der endothelialen Dysfunktion <i>in vitro</i> .....	15
<b>4</b>	<b>Ziele der Arbeit.....</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
5.1	Material .....	18
5.1.1	Puffer und Lösungen für Gelelektrophorese und Western Blot.....	24
5.2	Methoden.....	26
5.2.1	Methodenübersicht .....	26
5.2.2	Standardisierte Zellkultur .....	27
5.2.3	Analyse der Proteinexpression mittels Western Blots.....	32
5.2.4	Analyse der Proliferation mit dem xCELLigence® Real-Time Cell Analyzer .....	35
5.2.5	Untersuchung der Endothelfunktion mittels Angiogenese-Assay.....	40
<b>6</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
6.1	Thrombin aktiviert ERK und Akt dosis- und zeitabhängig .....	45
6.2	Desintegration des endothelialen Monolayers durch Thrombin .....	46
6.3	Störung der endothelialen Barriereintegrität durch Serumentzug und Thrombin.....	47
6.4	Dissoziation endothelialer Tubuli durch Serumentzug und Behandlung mit Thrombin.....	49

6.5	PETN reduzierte den Effekt von Serumentzug und Thrombin auf die Barriereintegrität .....	49
6.5.1	PETN reduzierte den Effekt von Serumentzug auf die Barriereintegrität ..	49
6.5.2	PETN reduzierte den Effekt von Thrombin auf die Barriereintegrität .....	51
6.6	Erhöhung der Stabilität endothelialer Tubuli durch PETN.....	52
6.7	Abschwächung der Phosphorylierung der ERK nach Thrombinbehandlung über 2 min durch Vorbehandlung mit PETN .....	53
6.8	Nach 10 min zeigte sich keine Änderung der thrombininduzierten Phosphorylierung der ERK durch PETN.....	54
<b>7</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>56</b>
7.1	Methodendiskussion .....	56
7.1.1	Zellkultur .....	56
7.1.2	Proteinnachweis im Western Blot .....	57
7.1.3	xCELLigence®-Versuche .....	58
7.1.4	Angiogenese-Assay.....	60
7.2	Ergebnisdiskussion.....	62
7.2.1	Wie verursachen Thrombin und Serumentzug Stress? .....	62
7.2.2	Welchen Effekt hat PETN <i>in vitro</i> ?.....	64
7.2.3	Welche Signalkaskaden sind an der Attenuierung der Endothelzellaktivierung beteiligt?.....	64
7.2.4	Was bewirkt die Hämoxygenase-1? .....	66
7.2.6	Welche anderen das Endothel beeinflussenden Therapiestrategien sind bekannt für die Behandlung von IUGR und Präeklampsie?.....	70
7.2.7	Wie ist die Bedeutung von PETN in die bisherigen therapeutischen Strategien einzuordnen?.....	72
<b>8</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick.....</b>	<b>74</b>
<b>9</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>76</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>88</b>
10.1	Abbildungsverzeichnis .....	88
10.2	Tabellenverzeichnis .....	89
10.3	Danksagung.....	91
10.4	Lebenslauf .....	92
10.5	Ehrenwörtliche Erklärung.....	93

## 1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ASS	Acetylsalicylsäure
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CO	Kohlenmonoxid
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dH <sub>2</sub> O	einfach destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECGM	endothelial cell growth medium – Wachstumsmedium für Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	extracellular signal-regulated kinase – extrazellulär regulierte Kinase
FKS	fetales Kälberserum
g	gravitational force – Erdbeschleunigung
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
h	hour – Stunde
HELLP	hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets – Hämolyse, erhöhte Leberenzyme, Thrombozytopenie
HO-1	Hämoxygenase-1
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells – humane Endothelzellen der Nabelschnurvene
IUGR	intrauterine growth restriction – intrauterine Wachstumsretardierung

kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	phosphate buffered saline – phoshatgepufferte Salzlösung
P-ERK	phosphorylierte ERK
PETN	Pentaerythryltetranitrat
PIGF	placental growth factor – plazentarer Wachstumsfaktor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA-Puffer	radioimmunoprecipitation assay buffer – Radioimmunoprezipitationspuffer
ROS	reactive oxygen species – Sauerstoffradikale
RTCA	Real-Time Cell Analyzer – Echtzeit-Zellanalysegerät
s	Sekunde
SDS	sodium dodecyl sulfate – Natriumdodecylsulfat
sFlt-1	soluble fms-like tyrosine kinase-1 – löslicher VEGF-Rezeptor-1
SSW	Schwangerschaftswoche
TBS	tris buffered saline – Tris-gepufferte Salzlösung
U	Units – Einheiten

## 2 Zusammenfassung

Präeklampsie und intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) sind Hauptursachen für peripartale und perinatale Morbidität und Mortalität. Beide Erkrankungen sind mit einer Entwicklungs- und Funktionsstörung der Plazenta assoziiert. Bei der Präeklampsie entwickelt die Mutter eine generalisierte endotheliale Dysfunktion mit Hypertonie und weiteren Organdysfunktionen insbesondere der Niere und der Leber. Bei der plazentabedingten IUGR erreicht ein Fetus sein genetisch vorgegebenes Wachstumspotential aufgrund einer verminderten plazentaren Perfusion nicht. Bei beiden Erkrankungen kommt es zu einer Dysbalance gefäßaktivierender und gefäßprotektiver Faktoren, durch ein Überwiegen der gefäßaktivierenden Faktoren wird eine endotheliale Dysfunktion verursacht. Bisher umfasst das Management bei diesen Erkrankungen intensive Überwachung, Blutdruckeinstellung der Mutter und frühzeitige Einleitung der Geburt bei Risiken für Mutter oder Kind. An weiteren Therapiestrategien wird aktuell geforscht.

In einer klinischen Studie konnten bei Hochrisikopatientinnen durch die Behandlung mit Pentaerythryltetranitrat (PETN) das Risiko für das Auftreten von IUGR reduziert und der Verlauf der Präeklampsie abgemildert werden. Der NO-Donor PETN führt durch die Erhöhung von Stickstoffmonoxid (NO) zu einer Dilatation der Gefäße und wirkt gleichzeitig durch die Induktion der Hämoxxygenase-1 (HO-1) protektiv auf Endothelzellen.

Ziel dieser Arbeit war es, *in vitro* zu zeigen, dass die klinischen Ergebnisse der Pilotstudie mit PETN mit einer Reduktion von endotheliale Stress zu begründen sein können. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte These lautet daher, dass PETN durch die Induktion protektiver Faktoren Endothelzellen vor Stress schützt.

Als Modelle zur Untersuchung der endothelialen Funktion wurden in der Zellkultur Endothelzellmonolayer und Angiogenese-Assays verwendet. Die endotheliale Dysfunktion wurde *in vitro* mit Thrombin und Serumentzug induziert. Es wurde untersucht, welchen Effekt die Stressinduktion auf die Endothelzellen hat und welchen Einfluss eine PETN-Vorbehandlung auf die gezeigte Stressreaktion hat.

Nach Stressinduktion kam es zu einem Barrierezusammenbruch, einer Abnahme der Kreuzungsstellen endothelialer Tubuli auf Matrigel™ und einer gesteigerten Phosphorylierung der ERK. Mittels Real-Time Cell Analyzer konnte gezeigt werden, dass PETN die Integrität der endothelialen Barriere signifikant erhöht. In den Angiogenese-Assays ließ sich durch PETN eine signifikante Stabilisierung der endothelialen Tubuli nachweisen. Bei der Untersuchung der Signaltransduktionsmoleküle mittels Western Blots zeigte sich nach Behandlung mit PETN eine verminderte Aktivierung der ERK. Gleichzeitig wurde im Western Blot bestätigt, dass durch PETN die Expression der endothelschützenden HO-1 induziert wird.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass durch die Behandlung mit PETN *in vitro* die durch endotheliale Stressoren induzierte endotheliale Dysfunktion signifikant attenuiert wird. Dies kann möglicherweise auch die klinisch gezeigten Effekte von PETN auf die Präeklampsie und die IUGR in der Pilotstudie erklären. Es wird vermutet, dass die Besserung der endothelialen Dysfunktion auf einer Wiederherstellung des Gleichgewichtes gefäßaktivierender und gefäßprotektiver Faktoren beruht. In der Folge werden durch eine Verbesserung der placentaren Funktion die IUGR und durch die Stabilisierung der endothelialen Funktion der Verlauf der Präeklampsie günstig beeinflusst.



## 3 Einleitung

### 3.1 Plazenta und Plazentation

Eine gut entwickelte Plazenta ist für die gesunde Entwicklung des Fetus essentiell. Hauptaufgabe der Plazenta ist die Versorgung des Fetus mit Sauerstoff und Nährstoffen (Moore et al. 2007, Schneider et al. 2016).

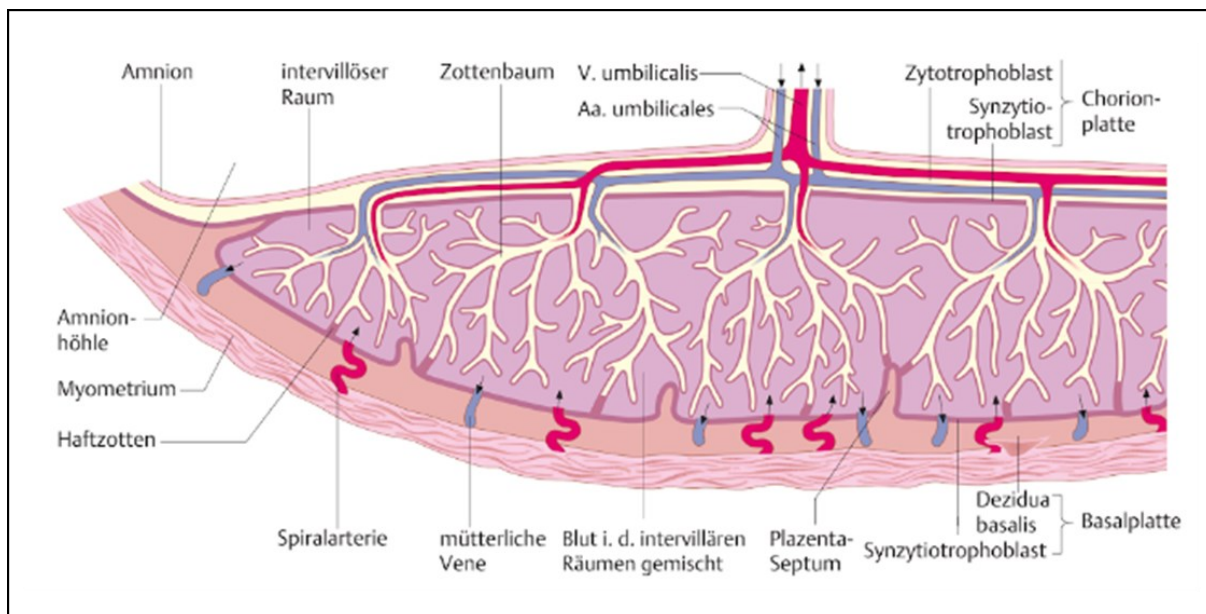
Entscheidend für eine adäquate Plazentation ist die Differenzierung des Trophoblasten. Aus diesem entwickelt sich der multinukleäre Synzytiotrophoblast und der mononukleäre Zytotrophoblast, welcher sich weiter in den villösen und extravillösen Trophoblasten differenziert (James et al. 2012, Moore et al. 2007).

Der villöse Trophoblast und der villöse Synzytiotrophoblast bilden Primärzotten aus, die sich über Sekundär- in Tertiärzotten umwandeln. Über die Zotten erfolgt die Ernährung des Fetus.

Der extravillöse Trophoblast invadiert das mütterliche Gewebe und erreicht die Spiralarterien von endo- und extravaskulär. In den Arterien bilden die endovaskulären Trophoblasten einen Pfropfen und verschließen diese im ersten Trimenon. Somit liegt während der Embryonalentwicklung ein niedriger Sauerstoffpartialdruck vor. Gegen Ende des ersten Trimenons werden die Spiralarterien eröffnet und die Zotten werden mit Blut umspült. Damit kommt es zu einem Wechsel von der histiotrophen zur hämatotrophen Ernährung des Embryos (Moore et al. 2007, Schneider et al. 2016, Weiss et al. 2016).

Die Bildung des multinukleären Synzytiums ist als erster Schritt der Plazentaentwicklung zu sehen. Der Synzytiotrophoblast erneuert und vergrößert sich durch ständige Fusion mit Zytotrophoblastzellen (Schneider et al. 2016). Vom Synzytiotrophoblasten schnüren sich immer wieder synzytiale Knoten in den intervillösen Raum ab. Diese bestehen aus apoptotischen Fragmenten, welche von einer Membran umgeben sind. Sie dienen der Entsorgung von gealtertem Material und

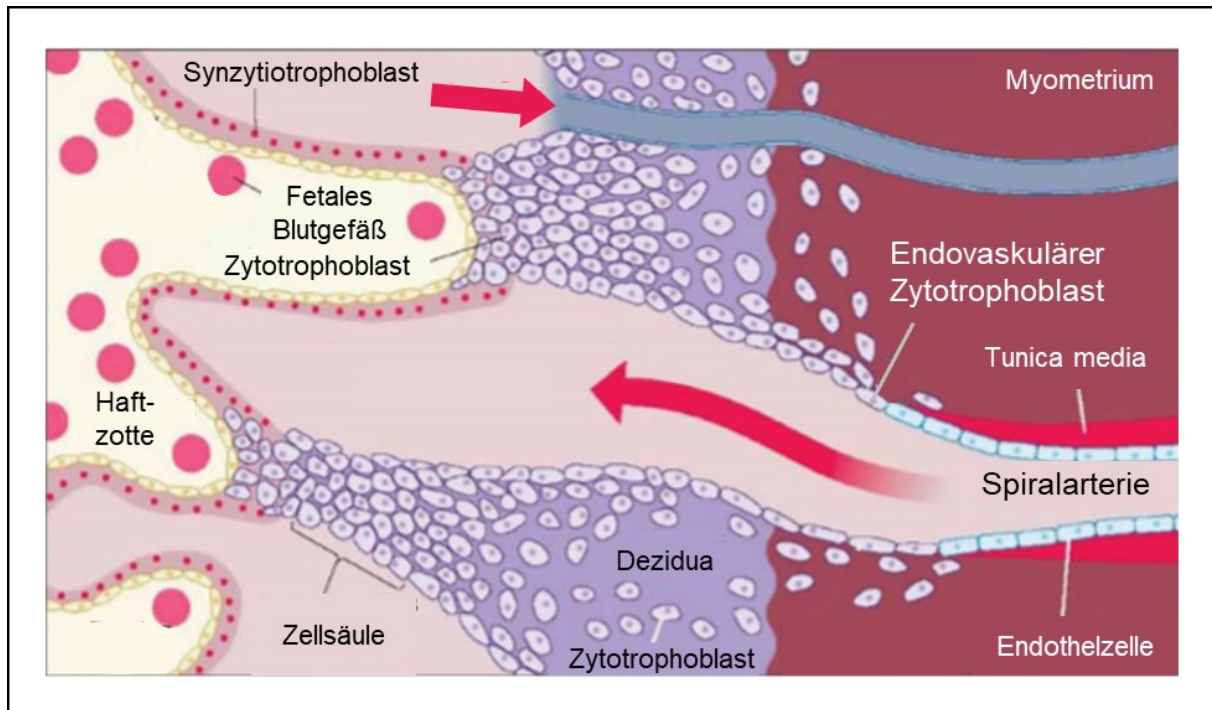
so der Homöostase des Synzytiotrophoblasten. Über die uterinen Venen gelangen die synzytialen Knoten in die Lunge und werden dort abgebaut (Huppertz 2008).



**Abbildung 1 Aufbau der reifen Plazenta**

Auf der fetalen Seite ist die Nabelschnur mit zwei Nabelarterien und einer Nabelvene dargestellt. Die fetalen Gefäße verzweigen sich innerhalb des Zottenbaums. Durch die maternalen Spiralarterien wird gegen Ende des ersten Trimenons der intervillöse Raum mit Blut gefüllt. An den Zotten erfolgt der Austausch von Sauerstoff und Nährstoffen vom mütterlichen ins kindliche Blut. Das sauerstoff- und nährstoffreiche Blut wird über die Nabelvene zum Fetus transportiert (Weyerstahl et al. 2013).

Ab dem zweiten Trimenon kommt es zu einer weiteren und tieferen Invasion der uterinen Arterien und des umgebenden uterinen Interstitiums. Die Invasion der Arterien durch endoarterielle Trophoblasten führt zur Desorganisation der Gefäßwände und zur Verdrängung von Endothelzellen. Damit einher geht ein Umbau der Wandstruktur der Arterien und es kommt circa ab der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) zur Dilatation der Arterien (Moore et al. 2007). Durch die Abnahme des Strömungswiderstandes verlangsamt sich die Flussgeschwindigkeit und die Versorgung des Fetus mit Sauerstoff und Nährstoffen wird begünstigt (Burton et al. 2009, Sadler und Langman 2008, Schneider et al. 2016).



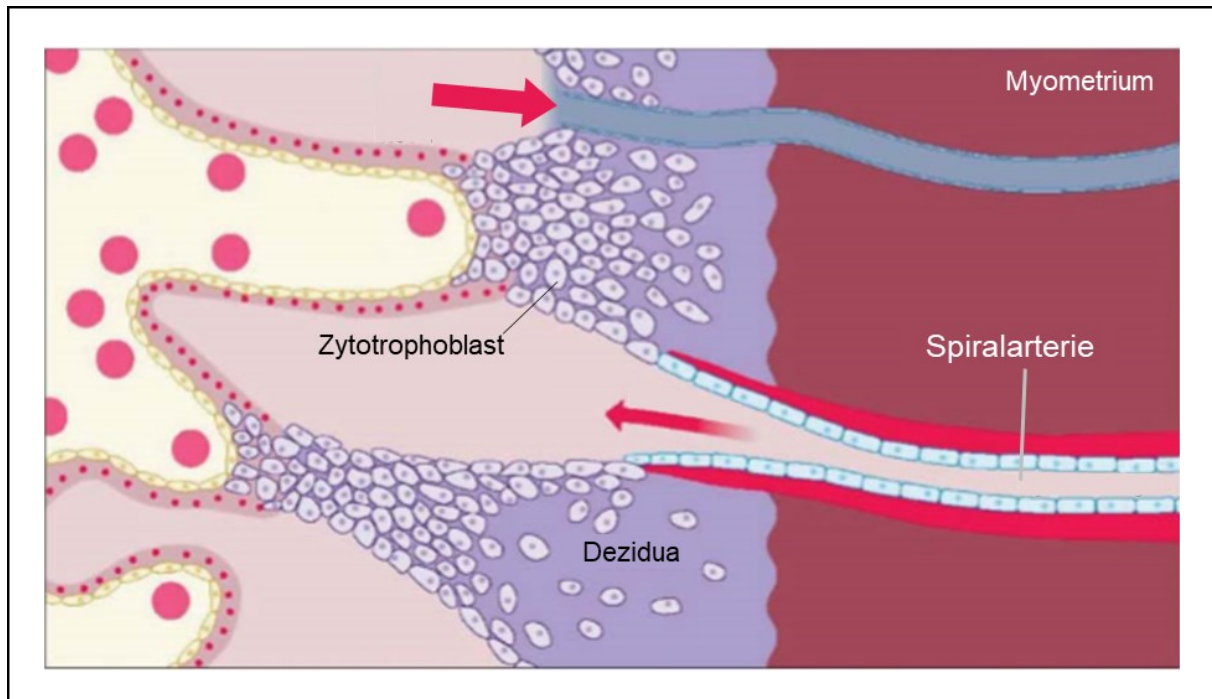
**Abbildung 2 Reguläre Plazentation**

Endovaskuläre Trophoblasten invadieren und desorganisieren die maternalen Spiralarterien. Dadurch kommt es ab der 20. SSW zur Umwandlung in weitlumige Gefäße. Dies verbessert die Versorgung des Feten (modifiziert nach Cerdeira und Karumanchi 2012).

### 3.2 Störungen der Plazentation

Bei einer gestörten Ausreifung der Plazenta entstehen plazentaassoziierte Schwangerschaftserkrankungen wie die intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) oder die Präeklampsie.

Die Störung der Plazentation hat ihre Ursache in der unzureichenden Differenzierung des Trophoblasten und resultiert in einer ungenügenden Umwandlung der mütterlichen Spiralarterien, die in den meisten Fällen zur plazentaren Insuffizienz führt (Huppertz 2008, Ness und Sibai 2006, Parker und Werler 2014, Powe et al. 2011, Sipos et al. 2013).



**Abbildung 3 Störung der Plazentation**

Wenn die Trophoblasten die Spiralarterien nicht invadieren, bleibt die Umwandlung der Arterien aus. Dies führt zu einer Minderversorgung des Feten (modifiziert nach Cerdeira und Karumanchi 2012).

Die Differenzierungsstörung kann verschiedenen Zellreihen betreffen. Daher können Präeklampsie und IUGR sowohl gemeinsam als auch unabhängig voneinander auftreten. Durch unzureichende Differenzierung des extravillösen Trophoblasten bleibt die Umwandlung der Spiralarterien aus und es kommt zur IUGR. Bei Fehlfunktion des villösen Trophoblasten werden vermehrt gefäßaktivierende Faktoren in den maternalen Kreislauf abgegeben, welche zur endothelialen Dysfunktion führen und das Krankheitsbild der Präeklampsie verursachen. Liegt sowohl eine Differenzierungsstörung des villösen Trophoblasten als auch des extravillösen Trophoblasten vor, kommt es zum kombinierten Auftreten von Präeklampsie und IUGR. In einer Studie wurde festgestellt, dass beim Auftreten der Präeklampsie vor der 32. SSW bei 84 % der Schwangeren gleichzeitig eine IUGR vorlag (Tan et al. 2018).

Eine vorbestehende maternale endotheliale Dysfunktion erhöht das Risiko für eine gestörte Gefäßumwandlung und damit für das Auftreten der IUGR. Durch die Vulnerabilität des Endothels tritt gleichzeitig die Präeklampsie häufiger auf. Beiden

Erkrankungen liegt folglich eine endotheliale Dysfunktion zu Grunde (Ness und Sibai 2006, Taylor et al. 2003).

Die gestörte plazentare Perfusion, lässt sich mittels Dopplersonographie der Arteria uterina nachweisen. Ein pathologischer Befund in der Dopplersonographie im Rahmen der Feindiagnostik zwischen 19. und 22. SSW ist daher hinweisgebend auf ein erhöhtes Risiko für die IUGR und auch für die Präeklampsie (Cnossen et al. 2008).

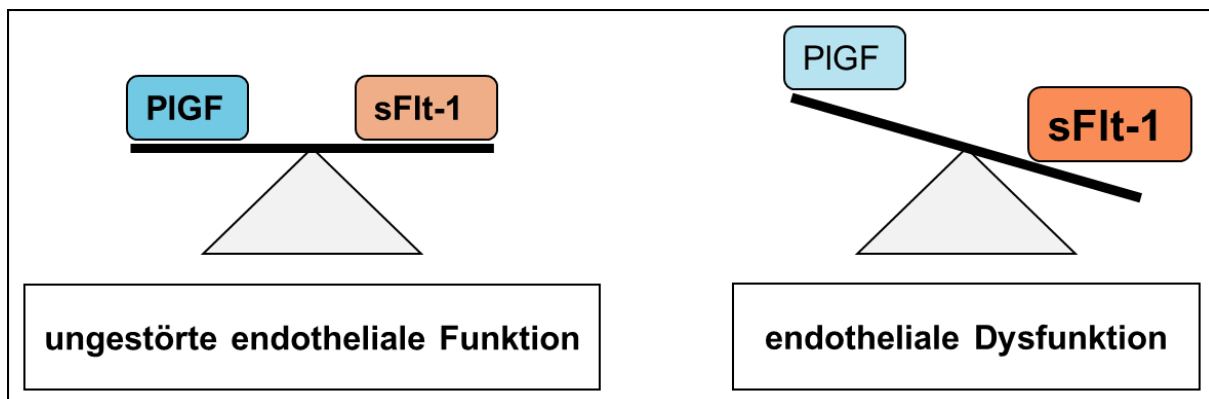
### **3.2.1 Präeklampsie**

Die Präeklampsie ist eine schwangerschaftsassozierte Erkrankung, welche definiert wird durch nach der 20. SSW neu auftretende Hypertonie und eine weitere maternale Organdysfunktion, die häufig die Niere betrifft und sich in einer Proteinurie zeigt (ACOG 2013a, Steegers et al. 2010). Sie tritt in drei bis fünf Prozent aller Schwangerschaften auf und ist weltweit eine der Hauptursachen für maternale Morbidität und Mortalität (Huppertz 2008, Lisonkova und Joseph 2013). Die Ursache der Entstehung wird als multifaktorieller Prozess gesehen und ist noch nicht abschließend geklärt und daher Gegenstand der Forschung.

Nach der aktuellen Hypothese zur Entstehung der Präeklampsie führt eine gestörte Differenzierung des villösen Trophoblasten in der frühen Schwangerschaft zur Freisetzung aponekrotischer Membranfragmente aus dem Synzytiotrophoblasten in den mütterlichen Kreislauf (Huppertz 2008). Diese frei im mütterlichen Blut vorliegenden Fragmente können das Kapillarbett der Lungen passieren und systemisch das Endothel aktivieren. Außerdem werden von der Plazenta gefäßaktivierende Faktoren wie der lösliche VEGF-Rezeptor-1 (sFlt-1) und Endoglin vermehrt freigesetzt (Huppertz 2008, Roberts und Hubel 2009). Diese Mediatoren bedingen eine Aktivierung des Endothels und führen zur endothelialen Inflammation (Ramma und Ahmed 2014, Redman et al. 2014).

Gleichzeitig wird der endothelprotektive plazentare Wachstumsfaktor (PIGF) in der reifungsgestörten Plazenta vermindert produziert (Ahmed 2011). Es kommt zu einem Ungleichgewicht von endothelprotektiven und endothelaktivierenden Faktoren im Kreislauf der Mutter und damit zu einer generalisierten endothelialen Dysfunktion mit

Gerinnungsaktivierung, Erhöhung der Permeabilität des Endothels und Blutdruckerhöhung (Ramma und Ahmed 2014).



**Abbildung 4 Endotheliale Dysfunktion bei Präeklampsie**

In einer gesunden Schwangerschaft liegt ein Gleichgewicht von proangiogenen Faktoren wie dem plazentaren Wachstumsfaktor (PIGF) und antiangiogenen Faktoren wie dem löslichen VEGF-Rezeptor-1 (sFlt-1) vor. PIGF wirkt über VEGF-Rezeptoren proangiogen und erhält die endotheliale Funktion. Bei Präeklampsie wird vermehrt sFlt-1 aus der Plazenta freigesetzt. sFlt-1 bindet PIGF, sodass PIGF nur noch in geringem Maße am Endothel wirken kann. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht auf die Seite der antiangiogenen Faktoren und es entsteht die endotheliale Dysfunktion der Mutter (modifiziert nach Ahmed und Cudmore 2009).

Die endotheliale Dysfunktion ist die Ursache für die mütterlichen Symptome der Präeklampsie. Die Endothelaktivierung führt zu peripherer Vasokonstriktion und in der Folge zu Hypertonie. Gleichzeitig wird das Endothel durchlässiger und es entstehen Ödeme. Die Gerinnungsaktivierung führt zur Bildung von Mikrothromben und zusammen mit der Vasokonstriktion zu Mikrozirkulationsstörungen. Dies verursacht eine Minderperfusion und Schädigung weiterer Organe, die sich beispielsweise bei der Niere als Proteinurie zeigt (Duley 2009, Young et al. 2010).

Auch weitere Organe wie Gehirn und Leber können von den Mikrozirkulationsstörungen betroffen sein. Diese Komplikationen der Präeklampsie sind die Eklampsie und das HELLP-Syndrom. Bei der Eklampsie, die in ein bis zwei Prozent der schweren Präeklampsien auftritt, kommt es zu Kopfschmerzen und Sehstörungen bis hin zu tonisch-klonischen Krämpfen und Koma. Das HELLP-Syndrom, welches in circa zehn Prozent der Präeklampsien auftritt, wird charakterisiert durch intravasale Hämolyse, erhöhte Leberenzyme und erniedrigte Thrombozyten (Duley 2009, Goulopoulou und Davidge 2015).

Präeklampsie und Eklampsie sind Hauptursachen für maternale und neonatale Morbidität und Mortalität (Duley 2009, Young et al. 2010). Lebenslang haben Frauen, die in einer vergangenen Schwangerschaft eine Präeklampsie aufwiesen, eine gestörte Endothelfunktion und damit ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Brown et al. 2013). Auch die Kinder von Müttern mit Präeklampsie haben ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen im späteren Leben (Davis et al. 2012, Jayet et al. 2010).

### **3.2.2 Intrauterine Wachstumsretardierung**

Die IUGR zeigt sich durch ein vermindertes Wachstum des Feten. Der Fetus erreicht dabei sein genetisch determiniertes Wachstumspotential nicht (ACOG 2013b). Definiert ist die IUGR durch eine pathologische Dopplersonographie und ein fetales Schätzwicht unter der zehnten Perzentile oder nicht perzentilengerechtes Wachstum. Die Ursachen der IUGR sind vielfältig und umfassen mütterliche Vorerkrankungen wie Autoimmunerkrankungen, Substanzmissbrauch in der Schwangerschaft und intrauterine Infektionen. Die überwiegende Zahl der Fälle von IUGR ist auf die beschriebene Störung der Plazentation zurückzuführen und Gegenstand dieser Arbeit (ACOG 2013b).

Die fetale Wachstumsretardierung erhöht das Risiko für neonatale Morbidität und Mortalität. Die perinatale Mortalität bei Wachstumsretardierung ist gegenüber nicht wachstumsretardierten Neugeborenen 10-20fach erhöht. Neonatale Anpassungsstörungen wie Atemnotsyndrom, nekrotisierende Enterokolitis, Retinopathia praematurorum, Störungen der Temperatur- und Blutzuckerregulation treten bei IUGR häufiger auf (Bernstein et al. 2000, Rosenberg 2008, von Beckerath et al. 2013).

Außerdem verändert die fetale Minderversorgung den endokrin-metabolischen Status des Fetus, wodurch lebenslang das Risiko für die Entwicklung des metabolischen Syndroms erhöht ist (Barker 2006, Kanaka-Gantenbein et al. 2003).

Auch Mütter von Kindern mit IUGR haben lebenslang ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Melchiorre et al. 2012, Smith et al. 2001). Sie leiden an einer chronischen endothelialen Dysfunktion.

### **3.3 Therapie und Prophylaxe der Plazentationsstörungen**

Sowohl für die Präeklampsie als auch für die IUGR fehlt bislang eine Therapie, welche die plazentaren oder endothelialen Ursachen zum Ziel hat. Bisher konnte nur in einigen Studien eine Besserung der Erkrankungen nachgewiesen werden (Huppertz und Schleußner 2018, Schneider et al. 2016).

Therapeutische Versuche mit Bettruhe und verschiedenen Ernährungsstrategien zur Verbesserung der fetalen Versorgung blieben bei der IUGR bislang erfolglos (ACOG 2013b). Auch die Prophylaxe mit Vitaminen und Nahrungsergänzungsmitteln brachte keine Änderung des Auftretens von Präeklampsie oder IUGR.

Die einzig kausale Therapie der Präeklampsie besteht in der Beendigung der Schwangerschaft, wenn die Mutter durch das Versagen der endothelialen Funktion lebensbedrohlich erkrankt. Dies ist jedoch mit dem Risiko der Frühgeburtlichkeit und der damit einhergehenden fetalen Unreife verbunden (Young et al. 2010).

Eine Metaanalyse zeigte, dass die Einnahme von Acetylsalicylsäure (ASS) vor der 16. SSW bei Schwangeren mit hohem Risiko für IUGR das Auftreten der IUGR vermindern konnte. Bei Einnahmebeginn nach der 16. SSW dagegen hatte ASS keine Auswirkung auf die Häufigkeit der IUGR (Roberge et al. 2017).

In einer doppelblinden placebokontrollierten multizentrischen Studie wurde nachgewiesen, dass die Einnahme von ASS zu einer signifikanten Reduktion des Auftretens von Präeklampsie bei Schwangeren mit erhöhtem Risiko für Präeklampsie führte (Rolnik et al. 2017). Bisher ist nicht geklärt, wie ASS das Auftreten der Präeklampsie verhindert. Auf das Auftreten der IUGR hatte Aspirin in dieser Studie keinen Effekt.



Das aktuelle Management von Präeklampsie und IUGR umfasst die regelmäßige Überwachung von Mutter und Kind, um in Abhängigkeit vom Gesundheitszustand der Mutter und dem Entwicklungsstand des Kindes den optimalen Zeitpunkt für die Einleitung der Geburt zu finden. Die Indikation zur Einleitung der Geburt als einzig kausale Therapie wird bei drohender Gefährdung von Mutter und Kind und bei auftretenden Komplikationen großzügig gestellt (ACOG 2013b, ACOG 2013a)

Dies zeigt die Notwendigkeit an der Erforschung von Therapiemöglichkeiten für Präeklampsie und IUGR. Dabei muss diese Therapie zum einen gut verträglich für Mutter und Kind sein und zum anderen das Auftreten oder den Schweregrad von IUGR und Präeklampsie vermindern.

### **3.4 Aktuelle Forschung an Therapieoptionen**

#### **3.4.1 Pilotstudie zur Therapie der Präeklampsie und der intrauterinen Wachstumsretardierung mit Pentaerythrityltetranitrat**

Im Rahmen einer klinischen Studie an der Klinik für Geburtsmedizin des Universitätsklinikums Jena konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Pentaerythrityltetranitrat (PETN) bei Patientinnen mit nachgewiesener verminderter Plazentaperfusion zu einer Reduktion des Risikos für IUGR, perinatalem Tod, Frühgeburt und vorzeitige Plazentalösung führte (Schleussner et al. 2014). Zusätzlich zeigte sich ein deutlich milderer Verlauf der aufgetretenen Präeklampsien, die später in der Schwangerschaft auftraten und seltener mit Frühgeburt und schwerer IUGR assoziiert waren (Groten 2014).

Als Ursache für die Reduktion der IUGR und das spätere Auftreten der Präeklampsie unter Therapie mit PETN wird die vasodilatatorische Wirkung von PETN verantwortlich gemacht. Die Senkung des Gefäßwiderstandes ist mit einer verbesserten Perfusion der Plazenta verbunden. Darüber hinaus aktiviert PETN endothelprotektive Enzyme, welche eine Verbesserung der Endothelfunktion bewirken (Dragoni et al. 2007, Schuhmacher et al. 2010). Dieser Effekt kann über die Vasodilatation hinaus eine

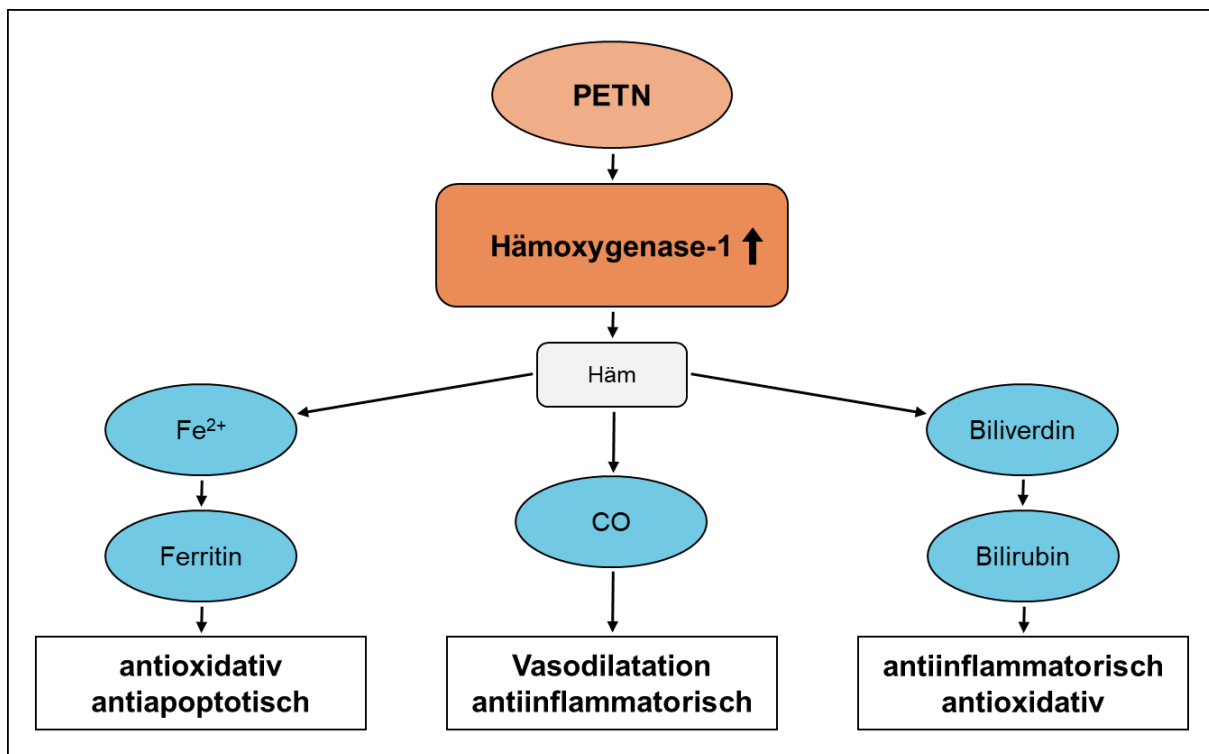
Besserung der endothelialen Funktion und damit eine Verbesserung der placentaren Perfusion und der maternalen Endothelstabilität bewirken.

### **3.4.2 Der NO-Donor Pentaerythrityltetranitrat**

NO-Donoren bewirken eine Gefäßdilatation und so eine Senkung des Blutdruckes. Bei Dauertherapie mit Nitraten wie beispielsweise Glycerintrinitrat kommt es zum Nachlassen der Wirkung, der sogenannten Nitrattoleranz. Eine Ausnahme hierbei stellt PETN dar, welches langanhaltend ohne die Nebenwirkung der Nitrattoleranz zu einer Vasodilatation führt (Daiber et al. 2008).

PETN induziert in Endothelzellen außerdem die Expression der antioxidativ wirkenden Hämoxxygenase (HO-1) (Daiber et al. 2012, Pautz et al. 2009). Der Wirkmechanismus der HO-1 beruht auf dem Abbau von Häm zu Kohlenmonoxid (CO), Eisenionen und Biliverdin, welches zu Bilirubin abgebaut wird (Sikorski et al. 2004). Dabei wirkt CO zusätzlich vasodilatatorisch und Bilirubin als Antioxidans (Daiber und Münzel 2015, George et al. 2014). Außerdem erhöht die HO-1 die Resistenz des Endothels gegenüber Sauerstoffradikalen (ROS) und wirkt so protektiv auf die Endothelfunktion (Kinderlerer et al. 2009).

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass es durch die PETN-induzierte Expression der HO-1 zu einer Abnahme der Bildung von ROS und zu einer Senkung des Blutdrucks ohne Entstehen von Nitrattoleranz kam (Schuhmacher et al. 2010, Wenzel et al. 2007). Darüber hinaus verlangsamte PETN durch die erhöhte Expression von HO-1 den Progress der Arteriosklerose (Oppermann et al. 2009, Polte et al. 2000). Bei Fehlen der HO-1 kam es umgekehrt zu ausgedehnter endothelialer Dysfunktion mit Gerinnungsaktivierung, intravasaler Hämolyse und Endotheluntergang (Yachie et al. 1999).



**Abbildung 5 Aktivierung der Hämoxxygenase-1 durch Pentaerythrityltetranitrat**

Pentaerythrityltetranitrat (PETN) induziert in Endothelzellen die Expression der Hämoxxygenase-1 (HO-1). Beim Abbau von Häm durch die HO-1 entstehen Kohlenmonoxid (CO), Biliverdin und Eisenionen (Fe<sup>2+</sup>). Die Eisenionen führen zur gesteigerten Expression von Ferritin, welches antioxidativ und antiapoptotisch wirkt. Biliverdin wird durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin abgebaut, welches antiinflammatorisch und antioxidativ wirkt. CO hat neben seinem vasodilatatorischen auch einen antiinflammatorischen Effekt (modifiziert nach Daiber und Münzel 2015)

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von PETN auf die endotheliale Funktion *in vitro* zu untersuchen und somit die Hypothese einer endothelschützenden Wirkung von PETN auf molekularer Ebene zu bestätigen.

Um den Zusammenhang der klinischen Ergebnisse der Pilotstudie mit der endothelprotektiven Wirkung von PETN nachweisen zu können, musste ein Modell für Induktion endothelialen Dysfunktion *in vitro* etabliert werden.

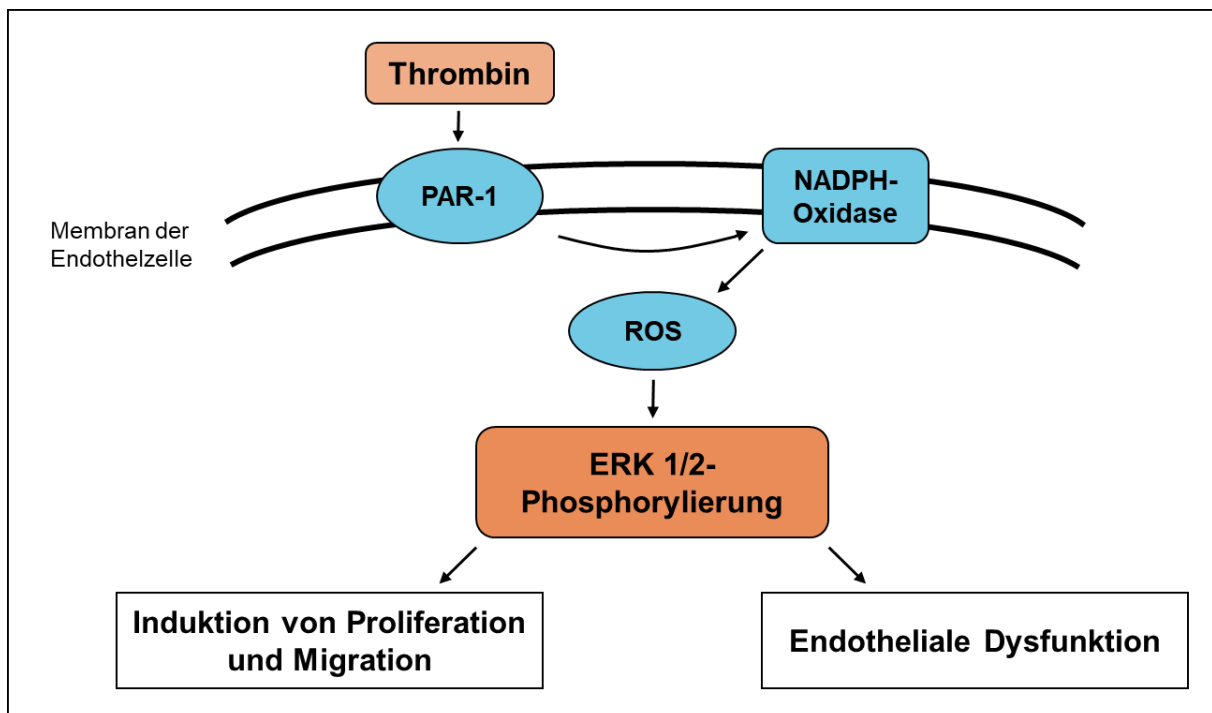
### 3.5 Endotheliale Dysfunktion *in vitro*

Zur Untersuchung des Effektes von PETN gegenüber Aktivatoren einer endothelialen Dysfunktion *in vitro* wurden als zelluläres Modell HUVEC-Monolayer (humane Endothelzellen der Nabelschnurvene) verwendet.

Endothelzellen eignen sich für die Versuche, da sie im direkten Kontakt mit dem Blut und daher auch mit Medikamenten und Hormonen stehen. Sie regulieren Blutfluss und Blutdruck und sind beteiligt an Inflamationsprozessen. Eine Störung der Endothelfunktion ist ein entscheidender Faktor in der Pathogenese vaskulärer Erkrankungen (Lei et al. 2016, Peters et al. 2009).

### **3.5.1 Induktion der endothelialen Dysfunktion *in vitro***

Die Behandlung von Endothelzellen mit Thrombin und Serumentzug zur Störung der Monolayerhomöostase ist etabliert (Adyshev et al. 2013, Kasa et al. 2013, Xie et al. 2016). Thrombin aktiviert an der Endothelzelle den Protease-aktivierten Rezeptor-1 (PAR-1), welcher zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört (Andrikopoulos et al. 2015, Bogatcheva et al. 2002, Coughlin 2005). Anschließend kommt es zur Aktivierung multipler Signalwege, die letztlich zur Dysfunktion der endothelialen Barriere führen. Vermittelt wird dies zum einen über inhibitorische G-Proteine (Guanosintriphosphat-bindende Proteine), welche die Adenylatzyklase hemmen und die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) vermindern. Durch die Aktivierung der Phospholipase C und die Bildung von Inositoltriphosphat kommt es zur Freisetzung von intrazellulärem Calcium. Durch die Verminderung von intrazellulärem cAMP und den erhöhten Calciumspiegel kommt es zur Aktivierung der Myosin-Leichtkettenkinase. Dies führt durch die Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette zur Kontraktion der Endothelzellen und zur Erhöhung der Permeabilität des Endothels (Coughlin 2005, Di et al. 2016, Macfarlane et al. 2001, Liu et al. 2001). Der erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel führt über die Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase 2 (NADPH-Oxidase) zur Bildung von ROS und schließlich zur Aktivierung von ERK 1 und 2 (Andrikopoulos et al. 2015, Ogawa et al. 2013). Die ERK (extracellular signal-regulated kinase) ist eine mitogenaktivierte Proteinkinase und steuert zelluläre Prozesse wie Proliferation und Migration. Sie wird durch Thrombin und andere Mitogene aktiviert und bei Aktivierung phosphoryliert. In der Folge kommt es zur Erhöhung der endothelialen Permeabilität sowie zu vermehrter Migration und Proliferation der Endothelzellen (Cai 2005, Kevil et al. 2000, Mehta und Malik 2006).



**Abbildung 6 Phosphorylierung der ERK durch Thrombin**

Thrombin aktiviert an der Endothelzelle den Protease-aktivierten Rezeptor-1 (PAR-1) und führt über die NADPH-Oxidase zur Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS). Diese bewirken die Phosphorylierung von ERK 1 und 2. Dadurch kommt es zur endothelialen Dysfunktion sowie zur Proliferation und Migration der Endothelzellen (nach Andrikopoulos et al. 2015).

Thrombin führt auch zu einer gesteigerten Phosphorylierung der Akt (Jeffers et al. 2015, Ogawa et al. 2013). Die Proteinkinase Akt auch Proteinkinase B genannt, induziert ebenfalls Proliferation und Migration in Endothelzellen und bewirkt außerdem die Aktivierung von Überlebenssignalen in der Zelle (Manning und Cantley 2007).

### 3.5.2 Nachweis der endothelialen Dysfunktion *in vitro*

In einem gesunden Endothel liegt ein Gleichgewicht aus Proliferation und Migration und Pro- und Antiinflammation vor (Higashi et al. 2014). Ein konfluentes Endothel in der Zellkultur ist charakterisiert durch Zell-Zellkontakt-vermittelte Wachstumshemmung, Schutz vor Apoptose und die Kontrolle der Permeabilität (Dejana 2004).

Eine intakte Monolayerfunktion zeigt sich durch eine konstante Dichte des Endothels und stabile Zell-Zellverbindungen, welche die Integrität des Endothels vermitteln. In einem dysfunktionellen Endothel dagegen kommt es zur Unterbrechung der Zell-

Zellverbindungen, damit zu einer erhöhten Permeabilität und der Induktion von Proliferation und Migration der Endothelzellen (Konstantoulaki et al. 2003, Ward et al. 2017, Xie et al. 2016).

Eine Möglichkeit zur Untersuchung der Dichte des Endothels besteht in der Messung der Impedanz im xCELLigence®-System. Ein intakter Monolayer zeichnet sich durch einen konstanten elektrischen Widerstand aus. Durch die Zugabe des endothelaktivierenden Thrombins wird die Barrierefunktion gestört und es kommt zum Zusammenbruch des Widerstandes im xCELLigence®-System.

Um der Situation *in vivo* näher zu kommen, wurde die endotheliale Dysfunktion zusätzlich in einem dreidimensionalen System untersucht. Als Matrix für das dreidimensionale System wurde Matrigel™ verwendet. Matrigel™ ist reich an extrazellulären Matrixproteinen, welche den Endothelzellen die Ausbildung von Netzstrukturen aus Tubuli ermöglichen (Grant et al. 1989). Durch Zugabe von Thrombin werden diese Tubuli zerstört (Blackburn und Brinckerhoff 2008).

## 4 Ziele der Arbeit

Die endotheliale Dysfunktion ist neben der Plazentareifungsstörung für die Entstehung und für den Schweregrad des Verlaufes der schwangerschaftsassozierten Erkrankungen Präeklampsie und IUGR von Bedeutung (Parker und Werler 2016).

Der verbesserte Verlauf von Präeklampsie und IUGR in der Pilotstudie lässt sich durch die endothelstabilisierende Wirkung von PETN und eine damit einhergehende Besserung der endothelialen Dysfunktion erklären. Dies sollte *in vitro* nachvollzogen werden.

Daher wurde folgende These aufgestellt:

PETN reduziert die durch Thrombin induzierte endotheliale Dysfunktion.

Zur Beantwortung dieser These dienten folgende Fragen:

1. Kann PETN den Effekt von Thrombin und Serumentzug auf die Störung der Barriereintegrität im xCELLigence®-System vermindern?
2. Erhöht PETN die Stabilität der Endothelzelltubuli im Angiogenese-Assay gegenüber einer Thrombinbehandlung?
3. Wird durch PETN die durch Thrombin induzierte Aktivierung von Signaltransduktionsmolekülen (ERK 1/2 und Akt) reduziert?

Die Ergebnisse sollen helfen nachzuvollziehen, wie PETN das Endothel bei schwangerschaftsassozierten Erkrankungen wie Präeklampsie und IUGR stabilisiert.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

**Tabelle 1      Geräte und Software**

Gerätetyp/Software	Bezeichnung	Hersteller
- 80°C Tiefkühlschrank	Cryo Cube F 570h	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Absorptionsspektrometer	SPECTROstar® Omega UV/Vis Absorptionsspektrometer	BMG LABTECH GmbH Ortenberg, Deutschland
Analysenwaage	Sartorius AX224	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Auswertsoftware des Absorptionsspektrometers	MARS Data Analysis Software	BMG LABTECH GmbH Ortenberg, Deutschland
Autoklav	Varioklav 75S	HP-Medizintechnik GmbH Oberschleißheim, Deutschland
Blotapparat	Fastblot™ B34	Biometra/Analytik Jena AG Jena, Deutschland
Chemikalienabzug	Tischabzug TA 1500	Laborbau-System Hemling GmbH & Co. KG Ahaus, Deutschland
Elektrophoresekammer	Mighty Small II	Hoefer Inc. San Francisco, Kalifornien, USA
Fluoreszenzmikroskop	Olympus IX 81	Olympus GmbH & Co. KG Hamburg, Deutschland
Folienschweißgerät	Krups Vacupack Plus F 380 70	Groupe SEB Deutschland GmbH Bereich: Krups GmbH Frankfurt am Main, Deutschland
Geldokumentationssystem	MF-ChemiBIS Version 3.2	DNR Bio-Imaging-Systems Jerusalem, Israel
Glasspritze für die Gelelektrophorese	Hamilton 705 NR 50µl Syringe	Hamilton Bonaduz AG Bonaduz, Schweiz
Inkubator	Galaxy® 170S	New Brunswick/Eppendorf AG Hamburg, Deutschland



Kühlzentrifuge	Mikro 220R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG Tuttlingen, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss Jena GmbH Jena, Deutschland
pH-Elektrode	F20 FiveEasy™ pH	Mettler-Toledo International Inc. Giessen, Deutschland
Pipettierhilfe für Auslaufpipetten	PIPETUS®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG Eberstadt, Deutschland
Pipetten (0,2-2 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	PIPETMAN Classic™	Gilson, Inc. Middleton, Wisconsin, USA
Präzisionswaage	Sartorius AX 224	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Schüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG Schwabach, Deutschland
Schüttler	KS 260 basic	IKA® Werke GmbH & Co. KG Staufen, Deutschland
Schüttler	Multi Bio RS- 24	Biosan Ltd. Riga, Lettland
Software des Geldokumentationssystems	Gelcapture Software Version 5.1	DNR Bio-Imaging-Systems Jerusalem, Israel
Software für die densitometrische Auswertung der Western Blots	Alphaview Version 3.2.2.0.	Cell Biosciences, vertrieben von Biozym Scientific GmbH Hessisch Oldendorf, Deutschland
Software für die statistische Auswertung	IBM SPSS Statistics 22	IBM Deutschland GmbH Ehningen, Deutschland
Software zur Auswertung der Angiogenese-Bilder	ImageJ® 1.50b	Rasband, W.S., US National Institutes of Health, Maryland, USA
Sterilwerkbank	Safe 2020 Class II Safety Cabinet	Thermo Fisher Scientific Inc., vertrieben von Thermo Electron LED GmbH Langenselbold, Deutschland

Stromversorgungsgerät für Elektrophorese und Western Blot	Electrophoresis Power Supply Consort EV 231	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
Stromversorgungsgerät für das Fluoreszenzmikroskop	External Power Supply Unit Olympus IX 2-UCB	Olympus GmbH & Co. KG Hamburg, Deutschland
Stromversorgungsgerät für die Quecksilberdampflampe	Olympus U-RFL-T Power Supply Unit für die Quecksilberdampflampe	Olympus GmbH & Co. KG Hamburg, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer comfort Eppendorf	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Vakuumpumpe	BioChem-VacuuCenter BVC 21NT	Vacuubrand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Vortexmischer	Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc. New York, USA
Waage	Kern 440-47N	Kern & Sohn GmbH Balingen, Deutschland
Wasserbad	GFL-1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH Burgwedel, Deutschland
xCELLigence®-Auswertsoftware	RTCA Software 1.2	ACEA Biosciences Inc. San Diego, Kalifornien, USA
xCELLigence®-Messgerät	xCELLigence® Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP	ACEA Biosciences Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Zellzählkammer	Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge	Universal 30F	Andreas Hettich GmbH & Co. KG Tuttlingen, Deutschland

**Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien**

Materialtyp	Bezeichnung	Hersteller
Auslaufpipetten (2/ 5/ 10/ 25 ml)	Cellstar® Serological Pipettes	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Blotmembran für Western Blot	PVDF Transfermembran,	Thermo Scientific

	0,45 µm	Rockford, Illinois, USA
Filterpapier für Western Blot	Filterpapier für Western Blot, 0,4 mm stark	Biostep GmbH Jahnsdorf, Deutschland
Gele für Western Blot	SERVAGel™ TG PRIME™ 10%	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
Kryogefäße (2 ml, Innengewinde)	LABSOLUTE® Cryo- Röhrchen plus	Th. Geyer GmbH & Co. KG Renningen, Deutschland
Mikrowellplatten	Cellstar® 96 Well Cell Culture Plate, sterile, F-bottom	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Pasteurpipetten (150/ 230 mm)	Assistant® Pipetten	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG Sonderheim/Rhön, Deutschland
Petrischalen (20,8 cm <sup>2</sup> )	Nuncclon™ Delta Surface	Nunc A/S Roskilde, Dänemark
Pipettenspitzen (1- 10/ 0,5- 20/ 1- 200/ 100- 1000µl)	Clear Line Low Binding Filter Tips	Kisker Biotech GmbH & Co. KG Steinfurt, Deutschland
Pipettenspitzen (0,5- 20/ 2- 200/ 50- 1000µl)	Plastibrand Pipettenspitzen, unsteril	Brand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5/ 1,5/ 2,0 ml)	SafeSeal Reagiergefäße	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
12-Well-Zellkulturplatten für Matrigelversuche	Falcon®-12-Well non-tissue treated Cell Culture Plate	Corning Inc. New York, USA
Xcelligence Mikrowellplatte für Proliferationsassay	E- Plate 16PET	Acea Biosciences Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> / 75 cm <sup>2</sup> )	Cellstar® Cell Culture Flask	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Cell Scraper, steril	Sarstedt AG & Co. KG Newton NC, USA
Zentrifugenröhrchen (15/ 50 ml)	Cell Star® Tubes	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland

**Tabelle 3 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme**

Chemikalien, Reagenzien, Enzyme	Hersteller
2-Mercaptoethanol 99 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
1,4-Dithiotreitol (DTT) ≥ 99 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG

	Karlsruhe, Deutschland
BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix (Katalognummer: 354234)	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V ≥ 98 %, pulverisiert	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Fluka analytical Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
CellTracker™ Green CMFDA, Invitrogen™	Fisher Scientific GmbH Schwerte, Deutschland
Cobalt-(III)-Protoporphyrin-(IX)-chlorid	Enzo Life Sciences (ELS) AG Lausen, Schweiz
Descosept AF	Dr. Schuhmacher GmbH Malsfeld, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥ 99,5 % p.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Calcium und Magnesium, steril	Gibco/ Life Technologies GmbH Thermo Fisher Scientific Darmstadt, Deutschland
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland
Ethanol Rotipuran® ≥ 99,8 %, nicht vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) ≥ 99 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Glycerin ≥ 98 % p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Glycin ≥ 99 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol), 99,8 % p.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Luminata Forte Western HRP Substrat (Katalognummer: WBLUF0100)	Merck Millipore Darmstadt, Deutschland
Methanol ≥ 99,5 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland

Natriumchlorid $\geq 99,5$ % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Natriumdesoxycholat $\geq 98$ % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS) Pellets	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa (Katalognummer: 26616)	Fisher Scientific GmbH Schwerte, Deutschland
Pentaerythrityltetranitrat 0,1 M in DMSO Katalognummer: 06532.0603)	Dottikon Exclusive Synthesis AG Dottikon, Schweiz
Phosphataseinhibitor	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
Polyethylenglycol-mono-[p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether (Triton® X-100)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Polyoxyethylen-(20)-sorbitan-monolaurat (Tween® 20)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Protease Inhibitor Mix (HP)	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
Supplement-Mix	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland
Thrombin (Katalognummer: T1063)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Base (Tris-Base), TRIZMA®	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl), TRIZMA®-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Trypanblau 0,4 % in PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,05 % in PBS	Gibco/ Life Technologies GmbH Thermo Fisher Scientific Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 4     Antikörper**

Bezeichnung	Katalognummer	Verdünnung	Hersteller
Anti-rabbit-IgG HRP-linked Antibody	7074S	1:10 000	Cell Signaling Technology®
β-Actin	4970S	1:1000	Cell Signaling Technology®
HO-1 polyclonal Antibody	ADI-SPA-894	1:20 000	Enzo Life Sciences, Inc.
AKT Antibody	9272	1:1000	Cell Signaling Technology®
Phospho-AKT (Ser473) Antibody	9271	1:1000	Cell Signaling Technology®
p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody	9102	1:2000	Cell Signaling Technology®
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (197G2) Rabbit mAb	4377	1:2000	Cell Signaling Technology®

**Tabelle 5     Kits**

Kit	Reagenzien	Hersteller
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Reagenz A und B, Albumin Standard (2 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH Waltham MA, USA

### 5.1.1 Puffer und Lösungen für Gelelektrophorese und Western Blot

RIPA-Lysepuffer	Zusammensetzung
NaCl	200 mM
Natriumdesoxycholat	1 %
Triton X-100	1 %
SDS	0,1 %
Tris-HCl pH 7,5	50 mM
EDTA	4 mM
Proteinaseinhibitor	5 µl / 1 ml RIPA-Lysepuffer

<b>Arbeitslösung für die Proteinbestimmung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Reagenz A	50 x
Reagenz B	1 x

<b>Probenpuffer (6 x)</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	7,0 ml
SDS	10 %
Glycerin	3,0 ml
DTT	0,6 M
Bromphenolblau	Spatelspitze

<b>Laufpuffer (10 x)</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Glycin	2 M
Tris-HCl	250 mM
SDS	1 %

<b>Laufpuffer (1 x)</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Laufpuffer (10 x)	100 ml / 1l ddH <sub>2</sub> O

<b>Transferpuffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Tris-HCl	48 mM
Glycin	39 mM
SDS	0,037 %
Methanol	15 %

<b>TBS (10 x)</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Tris-HCl	248 mM
NaCl	1,37 M
pH=7,6	
TBS-Tween (1x): TBS 1:10 mit dH <sub>2</sub> O verdünnen und 0,1 % Tween® 20 zusetzen	

<b>TBS-Tween (1 x)</b>	<b>Zusammensetzung</b>
TBS (10x)	100 ml / 1l ddH <sub>2</sub> O
Tween® 20	0,1%

<b>Stripp-Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Tris-HCl	62,5 mM

SDS	2 %
β-Mercaptoethanol	100 mM

Milchblocklösung	Zusammensetzung
TBS-Tween	1 x
Milchpulver	5 %

**Tabelle 6      Verwendete Zelllinie und Medium**

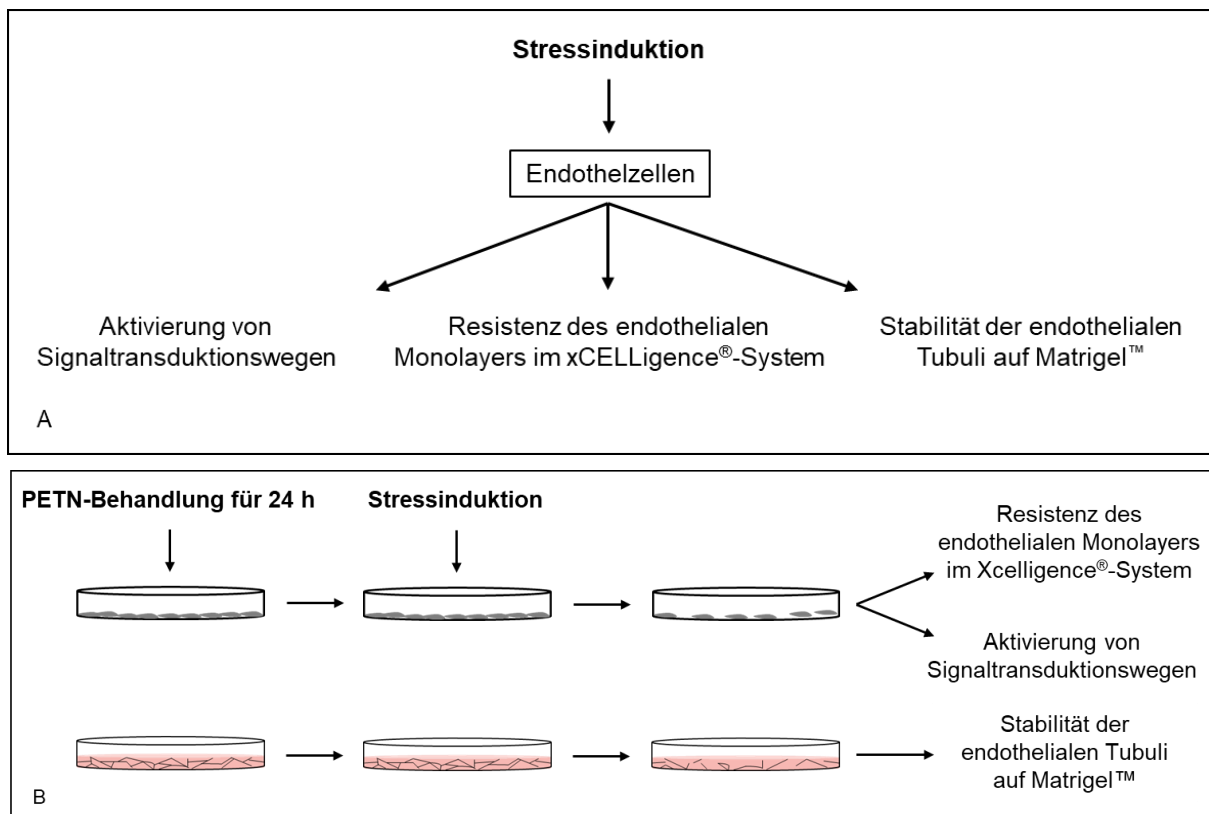
Zelllinie	Herkunft/Bezugsquelle	Beschreibung	Medium
HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)	PromoCell (C-12253) Heidelberg, Deutschland	Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen ( <i>pooled</i> )	ECGM (Endothelial Cell Basal Medium mit Supplement Mix, PromoCell, C-22010) mit 10 % FKS (Sigma-Aldrich)

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Methodenübersicht

Im experimentellen Ansatz wurde die Wirkung von PETN auf die Funktion von Endothelzellen in der Zellkultur untersucht. Zur Beurteilung der endothelialen Funktion wurden die Barriereintegrität von Endothelzellmonolayern im xCELLigence®-System, die Stabilität von Endothelzelltubuli auf Matrigel™ und Signalkaskaden der Endothelaktivierung im Western Blot untersucht. Der Einfluss einer Behandlung mit Thrombin oder Serumentzug als Modell für endothelialen Stress wurde jeweils in Anwesenheit und Abwesenheit von PETN analysiert. In den Kontrollansätzen wurde dabei das jeweilige Lösungsmittel mitgeführt, für PETN Dimethylsulfoxid (DMSO) und für Thrombin Bovines Serum Albumin (BSA). Während der Behandlung mit Thrombin oder der Kontrolle wurden die Zellen in serumfreien Medium inkubiert.





**Abbildung 7 Experimenteller Ansatz**

Als Nachweis der Stressinduktion in den Endothelzellen wurde die Aktivierung von Signaltransduktionswegen mittels Western Blots, die Resistenz im xCELLigence®-System und die Stabilität endothelialer Tubuli auf Matrigel™ untersucht (A). Zur Untersuchung der Wirkung von PETN auf die endotheliale Dysfunktion wurde die Stressinduktion mit den genannten Modellen nach Vorbehandlung mit PETN analysiert (B).

### 5.2.2 Standardisierte Zellkultur

Die in der Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit primären Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) der Firma PromoCell® GmbH durchgeführt. Die Zellen wurden maximal bis zur Passage zehn verwendet. Als Zellkulturmedium wurde das Wachstumsmedium für Endothelzellen (ECGM) verwendet, welchem 10 % fetales Kälberserum (FKS) und ein Supplement-Mix zugesetzt wurde.

Im Brutschrank erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37°C, 5 % Kohlenstoffdioxid und nahezu 100 % Luftfeuchte. Das Wachstum der Zellen wurde täglich lichtmikroskopisch kontrolliert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die Experimente mit den Endothelzellen wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt und die dabei genutzten Reagenzien vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

#### 5.2.2.1 Rekultivierung von Kryokonserven

Zur Kultivierung der Zellen wurde ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 8 ml Medium befüllt. Die aus dem Stickstofftank oder -80°C-Tiefkühlschrank stammende Kryokonserven wurde im Wasserbad angetaut bis 75 % der Zellsuspension aufgetaut waren. Mit 1 ml Kulturmedium wurde die angetaute Zellsuspension resuspendiert und in das vorbereitete Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 4 min bei 112 g zentrifugiert und der dabei entstandene Überstand verworfen. Das bei der Zentrifugation gebildete Zellpellet wurde mit 6 ml Medium resuspendiert und in eine 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche überführt.

#### 5.2.2.2 Passagieren von adhärenenten Zellen

Bei Konfluenz der Kulturflasche von 80 bis 90 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium mittels Vakuumpumpe entfernt und die Zellen mit phoshatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Durch Inkubation mit Trypsin-EDTA-Lösung für 3 min im Brutschrank wurden die Zellen enzymatisch vom Flaschenboden gelöst. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Ablösung der Zellen wurde durch Zugabe von Medium die Trypsin-EDTA-Lösung inaktiviert und die Zellen in eine neue Kulturflasche überführt. Dabei erhöhte sich die Passagenummer um eine Ziffer.

#### 5.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Um für experimentelle Ansätze eine definierte Zellzahl einsäen zu können, wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurden die mit Trypsin-EDTA gelösten und mit Medium resuspendierten Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. 10 µl dieser Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau vermischt und in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Lichtmikroskopisch konnten nun die lebenden von den toten Zellen unterschieden werden, da nur tote Zellen das Trypanblau aufnehmen. Durch Zählung der ungefärbten, lebenden Zellen in den vier Quadranten und Berechnung des Mittelwertes konnte unter Berücksichtigung der Verdünnung

anhand folgender Formel die durchschnittliche Zellzahl pro ml Medium bestimmt werden.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \text{Mittelwert der lebenden Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10\,000$$

#### 5.2.2.4 Herstellung von Kryokonserven

Um kultivierte Zellen einfrieren und für einen späteren Einsatz aufbewahren zu können, wurden Kryokonserven hergestellt. Das hierbei verwendete Einfriermedium setzte sich aus 45 % Kulturmedium, 45 % FKS und 10 % DMSO zusammen. Im Einfriermedium enthaltenes zytotoxisches DMSO verringert die Bildung von Eiskristallen und die Dehydrierung der Zellen und schützt somit vor einer Zerstörung der Zellen.

Bei Konfluenz der Kulturflasche von 90 bis 100 % wurde die Zahl der lebenden Zellen bestimmt. Nach der Zentrifugation des Reaktionsgefäßes bei 112 g für 4 min wurde das Pellet entsprechend der Gesamtzellzahl mit eiskaltem Einfriermedium resuspendiert ( $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml Einfriermedium) und in auf Eis stehende Einfriergefäße überführt.

Im Anschluss wurden die Einfriergefäße zügig in der mit Isopropanol gefüllten Kryoeinfrierbox bei - 80°C eingefroren. Nach 24 h erfolgte die Umlagerung in den Stickstofftank oder in Aufbewahrungsboxen, die bei - 80°C gelagert wurden.

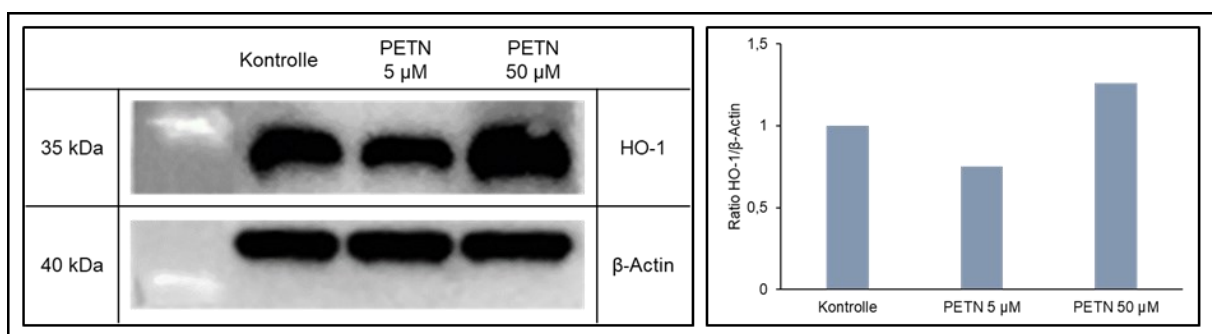
#### 5.2.2.5 Herstellung von Zellpellets

Um Proteine im Western Blot nachweisen zu können, wurden die Zellen nach Behandlung pelletiert. Zur Herstellung der Pellets wurde der Zellrasen mit 1 ml warmen PBS gewaschen und anschließend auf Eis mit 1 ml kaltem PBS versetzt. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst und die entstandene Zellsuspension nach mehrmaligem Resuspendieren in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 4°C, für 20 min bei 31 510 g wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei - 80°C gelagert.

### 5.2.2.6 Festlegung der PETN-Konzentration für die Versuche zur Untersuchung der endothelialen Dysfunktion

Bisher liegen keine Daten zu Serumkonzentrationen von mit PETN behandelten Menschen vor. Für die Untersuchung der endothelialen Dysfunktion in Abhängigkeit von einer PETN-Vorbehandlung, musste daher in einem Vorversuch die einzusetzende PETN-Konzentration festgelegt werden. Als Zielgröße diente hierbei die Expression der HO-1, die durch PETN induziert wird. Dafür wurden die Endothelzellen zu je 400 000 in Zellkulturplatten (20,8 cm<sup>2</sup>) eingesät. Bei Konfluenz wurden die HUVEC mit verschiedenen PETN-Konzentrationen über 24 h behandelt und Pellets aus den Zellen hergestellt. Die Pellets wurden zum Nachweis der HO-1 im Western Blot verwendet.

Nach einer Reihe von Optimierungen hinsichtlich der Blotbedingungen und der Konzentrationen der verwendeten Antikörper, konnte der Western Blot zum Nachweis der HO-1 Expression etabliert werden. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die Expression der HO-1. Eine Zunahme der Expression der HO-1 gegenüber der Kontrolle wurde bei Behandlung der Endothelzellen mit 50 µM PETN über 24 h nachgewiesen. Daher wurde diese Konzentration für die weiteren Versuche verwendet.



**Abbildung 8 Expression der Hämoxygenase-1 nach Stimulation der Endothelzellen mit Pentaerythryltetranitrat 5 µM und 50 µM über 24 h**

Dargestellt ist ein exemplarischer Western Blot, der die Expression der Hämoxygenase-1 (HO-1) nach PETN-Behandlung zeigt. Als Kontrolle wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) entsprechend der höheren PETN-Konzentration verwendet. Es wurden gleiche Proteinmengen eingesetzt und zur Kontrolle β-Actin bestimmt. Es stellte sich ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die Expression der HO-1 dar und nach Stimulation mit 50 µM PETN wurde eine erhöhte Expression gegenüber der Kontrolle nachgewiesen.

#### 5.2.2.7 Dosis- und zeitabhängige Aktivierung der ERK und der Akt durch Thrombin

Zur Untersuchung der endothelialen Dysfunktion wurden in Vorversuchen verschiedene Thrombinkonzentrationen und Behandlungszeiten auf ihren Einfluss auf Signaltransduktionswege getestet. Als Zielgröße wurde die Phosphorylierung der ERK und der Akt verwendet.

Dafür wurden je 400 000 Endothelzellen in Zellkulturplatten (20,8 cm<sup>2</sup>) ausgesät. Bei Konfluenz wurden die HUVEC mit verschiedenen Thrombinkonzentrationen über verschiedene Behandlungszeiten inkubiert (Tabelle 7). Nach der Behandlung wurde Phosphataseinhibitor im Verhältnis 1:100 zugegeben und Pellets aus den Zellen hergestellt. Die Pellets wurden zum Nachweis der Signalkaskaden ERK, P-ERK, Akt und P-Akt im Western Blot verwendet.

**Tabelle 7      Verwendete Thrombinkonzentrationen und Behandlungszeiten**

Thrombin- konzentration in U/ml \ Zeit in min	2	10	30
0,1	x	x	x
1	x	x	x
10	x	x	x

#### 5.2.2.8 Behandlung der HUVEC mit Thrombin nach Vorbehandlung mit PETN

Auf Zellkulturplatten (20,8 cm<sup>2</sup>) wurden jeweils 400 000 HUVEC eingesät. Bei Konfluenz von 100 % wurde ein Teil der Platten mit PETN 50 µM und als Kontrolle ein Teil mit DMSO, dem Lösemittel von PETN, für 24 h inkubiert.

Danach wurde das Medium verworfen und die zuvor mit PETN behandelten Zellen wurden mit serumfreiem Medium mit PETN 50 µM für 4 h inkubiert. Die Kontrollansätze wurden mit serumfreiem Medium mit DMSO ohne PETN für 4 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Thrombin für 2 min und 10 min.

Nach der Behandlung wurde Phosphataseinhibitor im Verhältnis 1:100 zugegeben und mikroskopische Aufnahmen der Kulturplatten gemacht. Die Aufnahmen erfolgten mit

dem Mikroskop Axiovert 25 mit 100facher Vergrößerung. Anschließend wurden aus den Zellen Pellets hergestellt.

### **5.2.3 Analyse der Proteinexpression mittels Western Blots**

#### **5.2.3.1 Herstellung von Lysaten**

Um die Expression von Signaltransduktionsmolekülen mittels Western Blots bestimmen zu können, wurden die hergestellten Pellets lysiert. Zur Herstellung der Lysate wurden die Pellets mit 100 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert und für 30 min bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Durch Zusatz von Proteaseinhibitor-Mix zum Puffer wurde der Proteinabbau und durch die Zugabe von Phosphataseinhibitor eine weitere Phosphorylierung der Proteine verhindert. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 4°C und 31 510 g für 20 min konnte das Lysat der Proteine in ein neues 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei - 20°C gelagert werden.

#### **5.2.3.2 Proteinbestimmung**

Mittels eines Protein-Assay-Kits wurden die Proteinkonzentrationen der Lysate durch das Absorptionsspektrometer bestimmt. Die Proteinstandards wurden mit RIPA-Lysepuffer auf Konzentrationen zwischen 0 und 2000 µg/ml eingestellt. In Duplikaten wurden von jeder Standardlösung und den zu analysierenden Proben jeweils 10 µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe der Arbeitslösung (200 µl/Well) und Inkubation für 30 min im Brutschrank wurde die optische Dichte der Kavitäten bei 562 nm im Absorptionsspektrometer gemessen.

Die Proteinkonzentrationen der Lysate konnten anhand der Standardkurve, die sich aus den Proteinstandards ergab, mit der MARS®-Datenanalysesoftware kalkuliert werden.

#### 5.2.3.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-PAGE werden Proteine durch elektrischen Strom der Größe nach aufgetrennt. Durch Detektion mit spezifischen Antikörpern können einzelne Proteine nachgewiesen werden.

Vor Benutzung wurden alle Gerätschaften mit 70 % Ethanol gereinigt und zur Vermeidung einer Kontamination während der gesamten Arbeit Handschuhe getragen.

Zur Auftrennung der Proteine wurden Gele der Firma Serva Electrophoresis GmbH verwendet. Diese wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit 1 x Laufpuffer gefüllt. Von den Lysaten wurde das Volumenäquivalent zu 5 µg Proteinmenge mit 6 x Probenpuffer versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf gleiche Volumina aufgefüllt. Die Proben wurden bei 95°C für 5 min denaturiert und kurz zentrifugiert.

Mit einer Glasspritze wurden die Proben und 5 µl eines Proteinstandards, der die spätere Zuordnung der Proteinbanden ermöglichte, in die Taschen des Gels pipettiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Spritze jeweils mit Laufpuffer gespült. Dann erfolgte die Elektrophorese bei 30 mA pro Gel, 8 W und entsprechender Spannung für 90 min.

#### 5.2.3.4 Semi-Dry Western Blot

Nach der Elektrophorese wurden überschüssige Gelabschnitte entfernt und das Gel 5 min in Transferpuffer inkubiert. Eine der Größe des Gels entsprechende Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) wurde 30 s in Methanol aktiviert und für 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Dann erfolgte der Aufbau des Blots von der Anode der Blotkammer aus mit drei Lagen in Transferpuffer getränktes Filterpapier, der PVDF-Membran, dem Gel und weiteren drei Lagen in Transferpuffer getränktes Filterpapier. Zwischen den Schichten entstandene Luftblasen wurde durch Ausrollen mit einer Pipette entfernt und die Blotkammer durch Aufsetzen der Kathode geschlossen. Die Übertragung der aufgetrennten Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran erfolgte bei einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> für 60 min.

#### 5.2.3.5 Immunodetektion

Nach dem Blot wurde die Membran zur Sättigung unspezifischer Proteinbindestellen in 5 %iger Milchlösung bei Raumtemperatur für 30 min geschwenkt. Im Anschluss wurde die Membran geteilt und der untere Teil mit dem HO-1-Antikörper und der obere Teil mit dem P-ERK-Antikörper in 5 %iger Milchlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Immunodetektion zum Nachweis von ERK und  $\beta$ -Actin wurde nach Entfernung der vorher gebundenen Antikörper durchgeführt.

Am Folgetag wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-Tween® 20 gewaschen und mit dem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper in 5 %iger Milchlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Um ungebundene Antikörperreste zu entfernen, wurde die Membran erneut dreimal 10 min mit TBS-Tween® 20 gewaschen.

Zur Detektion der Proteine wurde Luminolsubstrat auf die Membran pipettiert und diese anschließend in eine Folie gelegt. Mit dem ChemiBIS® und der dazugehörigen GelCapture®-Software konnten die Chemolumineszenzsignale der detektierten Proteine dargestellt werden. Im Anschluss wurde die Membran mit TBS-Tween® 20 gewaschen und in einer luftdicht verschweißten Folie bei 4°C gelagert.

#### 5.2.3.6 Entfernung gebundener Antikörper von der Blotmembran (Stripping)



Um weitere Proteine auf einer Membran detektieren zu können, mussten die vorher gebundenen Antikörper entfernt werden. Dafür wurde die Membran 30 min in einem Stripp-Puffer geschwenkt und anschließend mehrfach mit dH<sub>2</sub>O gewaschen, um das verwendete  $\beta$ -Mercaptoethanol vollständig zu entfernen. Dann konnte diese Membran zur Immunodetektion von ERK und  $\beta$ -Actin verwendet werden.

#### 5.2.3.7 Auswertung der Western Blots

Mit der Software Alphaview wurden die Banden der Western Blots densitometrisch ausgewertet. Zur Bestimmung der Phosphorylierung von ERK unter den verschiedenen Versuchsbedingungen wurde das jeweilige Verhältnis aus P-ERK und ERK gebildet. Um einen Unterschied zwischen den Behandlungen ermitteln zu



können, wurde die Zunahme des phosphorylierten Anteils von ERK nach Behandlung ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt. Hierzu wurden die Werte der Kontrolle auf 1 gesetzt und der Effekt der Behandlung als Vielfaches von 1 dargestellt.

Behandlung				
	Kontrolle 2 min	PETN + Thrombin 2min	Kontrolle 2 min	PETN + Thrombin 2 min
DMSO	+	+	PETN -	+
BSA	+	+	DMSO +	+
Thrombin	+	+	Thrombin +	+
PETN	-	+	BSA +	+
<b>Protein</b>	<b>Densitometrie in Pixel</b>			
ERK	75636,7	97902,33		
P-ERK	133026,89	87563		
<b>Berechnung der Quotienten</b>				
P-ERK/ERK	1,76	0,89		
Verhältnis	1	0,51		

**Abbildung 9 Beispielhafte Darstellung der Auswertung der Western Blots**

Dargestellt sind ein Western Blot und die zugehörigen densitometrischen Messungen. Um die Zunahme der Phosphorylierung der ERK ermitteln zu können, wurde das Verhältnis aus P-ERK und ERK gebildet. Im Anschluss wurden die Werte der Kontrolle auf 1 gesetzt und die Behandlung mit PETN als Vielfaches von 1 dargestellt.

#### 5.2.3.8 Statistische Auswertung der Western Blots

Aufgrund der geringen Wiederholungszahl der Western Blot-Versuche konnte eine Normalverteilung der densitometrischen Ergebnisse nicht angenommen werden. Für die statistische Auswertung wurde daher der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Dabei wurden die Quotienten P-ERK/ERK von PETN + Thrombin mit der Kontrolle verglichen. Hierzu wurde die Software IBM SPSS Statistics® 22 verwendet und ein p-Wert von < 0,05 als signifikant gewertet.

#### 5.2.4 Analyse der Proliferation mit dem xCELLigence® Real-Time Cell Analyzer

Um den Einfluss von PETN auf die Wirkung von Thrombin auf die endotheliale Barriere zu untersuchen, wurde mit dem xCELLigence® Real-Time Cell Analyzer (RTCA) die

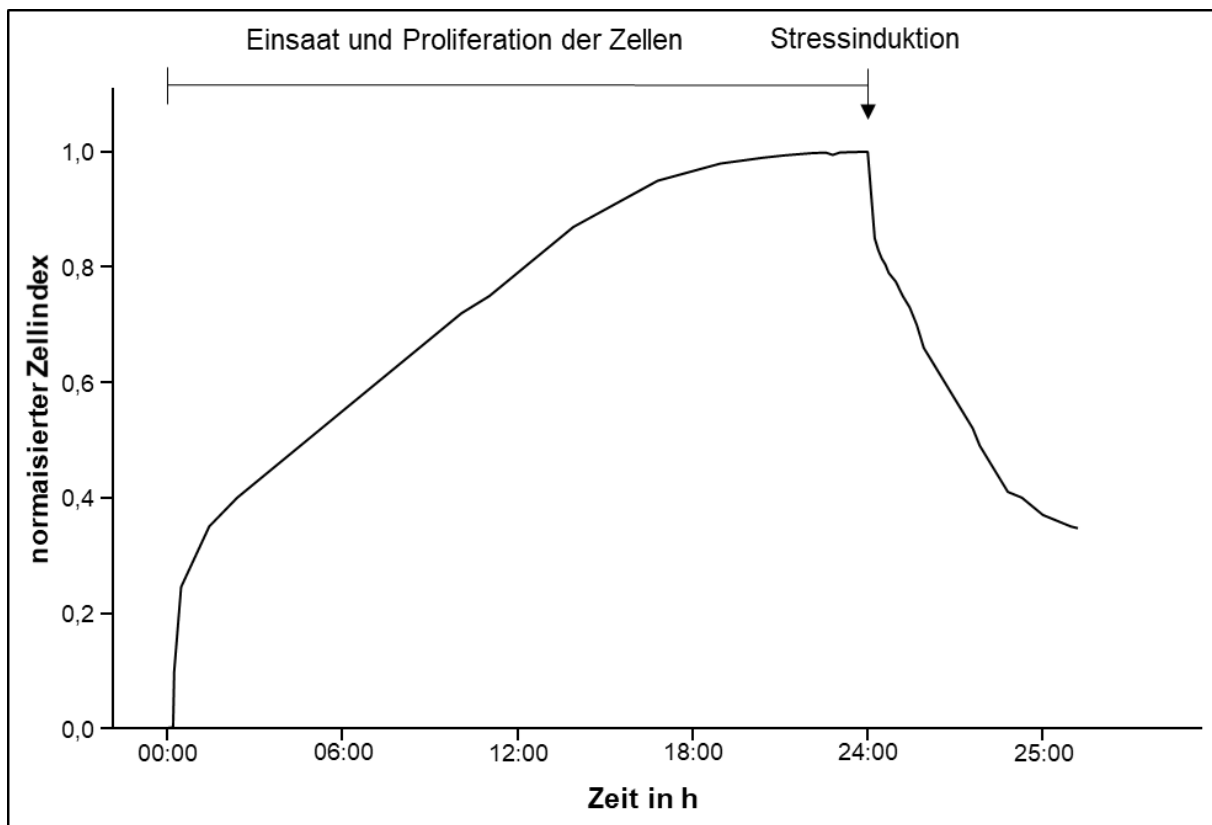
Dichte der Endothelzellen in Abhängigkeit von verschiedenen Versuchsbedingungen gemessen.

Für diese Versuche wurden E-Plates® 16 verwendet, bei denen in zwei Spalten jeweils acht Wells untereinander angeordnet sind. In diesen Wells wachsen die Zellen am Boden auf einer Mikroelektrode an. Dabei kommt es in Abhängigkeit von der Dichte der Zellen zu einer Änderung der Impedanz, die von der RTCA-Software graphisch dargestellt werden kann.

Durch das Programm wird die Impedanz in Form des einheitslosen Parameters Zellindex (CI) dargestellt. Der Zellindex ergibt sich aus der Impedanz der Elektrode mit Medium (Rb) und der Impedanz der Elektrode mit Zellen (Rn) nach der Formel

$$CI = \frac{Rn - Rb}{Rb} \text{ (AceaBiosciences 2013).}$$

Zur Analyse der Veränderung der Dichte der Endothelzellen nach der entsprechenden Behandlung wurde der normalisierte Zellindex verwendet. Dieser normalisierte Zellindex ist definiert als Quotient aus dem aktuellen Zellindex und dem Zellindex vor Behandlungsbeginn (AceaBiosciences 2017).



**Abbildung 10 Änderung der Impedanz in Abhängigkeit von Zelladhäsion und Zellstress**

Bei Zugabe der Endothelzellen in die E-Plate® kommt es aufgrund der Adhäsion der Zellen zu einem schnellen Anstieg der Impedanz, welche durch die RTCA-Software in Form des normalisierten Zellindex dargestellt wird. Im weiteren Verlauf flacht der Anstieg ab bis er bei Konfluenz der Zellen eine Plateauphase erreicht. Durch Stressinduktion kommt es zu Dissoziation des endothelialen Monolayers, welches zu einer Abnahme der Impedanz führt. Im Graphen ist dies in dem Abfall des normalisierten Zellindex zu erkennen.

#### 5.2.4.1 Vorversuch zur Bestimmung der Zellzahl für die xCELLigence®-Versuche

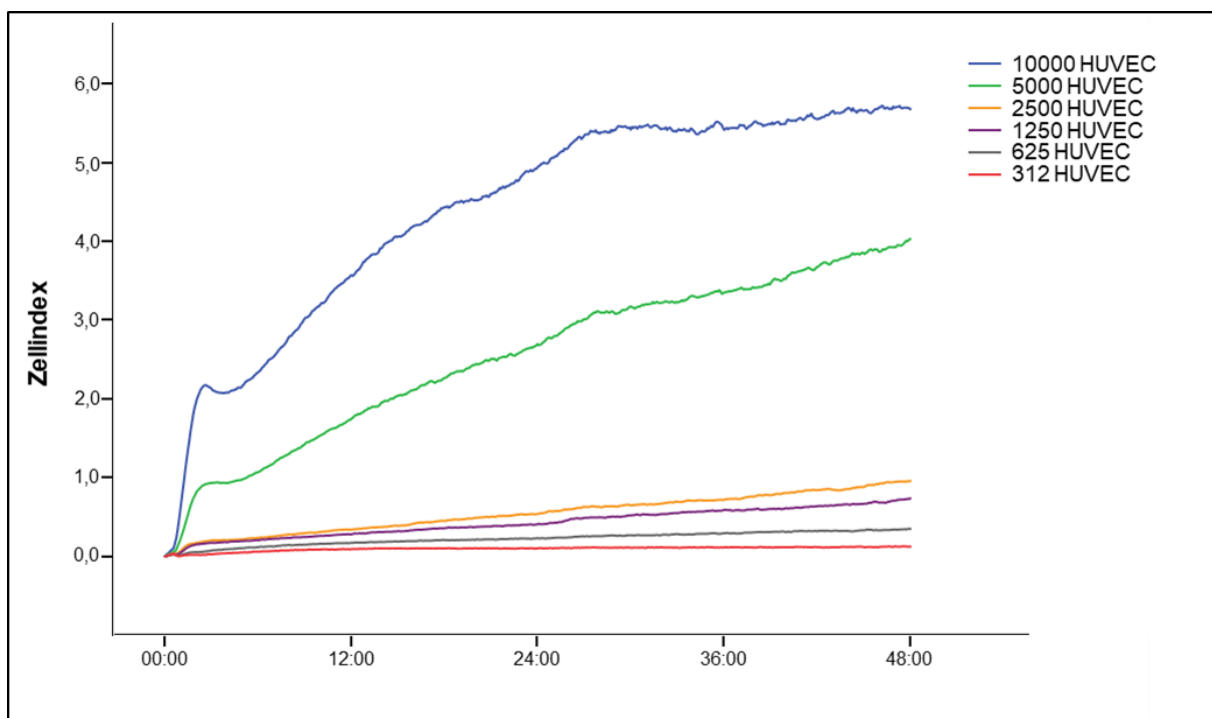
Zur Festlegung einheitlicher Versuchsbedingungen für die Untersuchung des Einflusses von PETN auf die Endotheldichteveränderungen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen waren Vorversuche notwendig. Die Stressinduktion sollte in der stationären Phase und nach Inkubation der Zellen mit PETN über 24 h erfolgen. Ziel der Vorversuche war daher die Bestimmung der einzusetzenden Zellzahl, bei der nach 24 h die stationäre Phase erreicht wird.

Vor dem Versuch inkubierte das Messgerät 2 h im Brutschrank. Dann wurden die Wells einer E-Plate® mit je 100 µl Medium gefüllt und inkubierten 30 min im Brutschrank.

Während der Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen einer 25 cm<sup>2</sup> Kulturf flasche trypsinisiert und gezählt. Anschließend wurden die HUVEC in sechs Zellkonzentrationen von 312 bis 10 000 Zellen pro 200 µl in die Wells der E-Plate® gesät, wobei die jeweils benachbarten Wells die gleiche Behandlung erhielten. Die Proliferation wurde über sechs Tage gemessen bis die Zellen in jedem Well die stationäre Phase erreicht hatten. Jeden zweiten bis dritten Tag fand ein Mediumwechsel statt.

Bei Einsaat von 10 000 Zellen zeigen sich die typischen Phasen einer Wachstumskurve in der Zellkultur, die lag-Phase, die log-Phase und die stationäre Phase. Nach 24 h erreichte die Wachstumskurve ihr Plateau (Abbildung 11).

Für die xCELLigence®-Versuche wurde eine Zellzahl von 10 000 pro Well ausgewählt und als Behandlungszeitpunkt der Zeitpunkt 24 h nach Einsaat ausgewählt.



**Abbildung 11 Proliferation der HUVEC über 48 h**

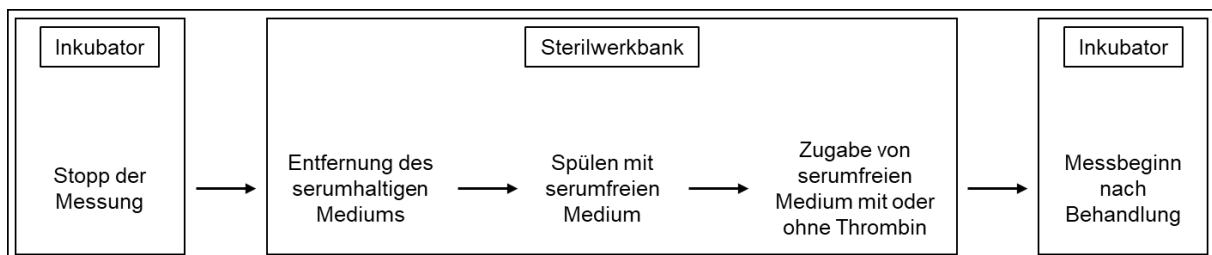
Die Endothelzellen wurden in verschiedenen Zellkonzentrationen in die Wells einer E-Plate® gesät und die Proliferation mittels xCELLigence®-System gemessen. Dargestellt ist das Wachstum über die ersten 48 h. Nach 24 h wurde in den Wells mit 10 000 HUVEC/Well die stationäre Phase erreicht. Daher wurde diese Zellzahl für die weiteren Versuche verwendet und die Behandlung mit Thrombin oder Serumentzug nach 24 h Inkubation im RTCA-Gerät durchgeführt. Die Kurven zeigen die Messwerte eines Versuches.

#### 5.2.4.2 Untersuchung der endothelialen Dysfunktion im xCELLigence®-System

Die Durchführung der xCELLigence®-Versuche erfolgte wie in der oben beschriebenen Methode. Bei diesen Versuchen wurde dem Medium PETN 50 µM oder DMSO als Kontrolle zugefügt. Es wurden je 10 000 Zellen pro Well eingesät und die Platten für 24 h in dem Gerät im Brutschrank inkubiert.

Nach 24 h wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt und die Behandlung mit Thrombin und Serumentzug durchgeführt.

Wie in Abbildung 12 dargestellt musste die Platte für die Behandlung aus dem Inkubator entnommen, das serumhaltige Medium abgesaugt, die Platte mit serumfreiem Medium gewaschen und vorsichtig das Medium für die Behandlung zugegeben werden. Dadurch konnten in den ersten Minuten direkt nach Behandlungsbeginn keine Messwerte aufgenommen werden.



**Abbildung 12 Schema zur Durchführung der Behandlung im xCELLigence®-System**

Für den Serumentzug und die Behandlung mit Thrombin musste die Messung der Proliferation der HUVEC gestoppt werden. Anschließend wurde die E-Plate® in die Sterilwerkbank transferiert. Dort wurde das serumhaltige Medium abgesaugt, die Platte mit serumfreiem Medium gespült und das vorbereitete serumfreie Medium mit oder ohne Thrombin zugegeben werden. Anschließend wurde die E-Plate® wieder in das Gerät im Inkubator eingesetzt und die Messung konnte fortgesetzt werden.

Die Veränderung der Dichte der Endothelzellen wurde über 4 h alle 5 min (fünf Versuche) und im Minutentakt (drei Versuche) mittels des xCELLigence®-Systems gemessen.

Zur Analyse der Veränderung der Dichte der Endothelzellen nach der entsprechenden Behandlung wurden die Mittelwerte der normalisierten Zellindizes der Duplikate verwendet.

#### 5.2.4.3 Auswertung der xCELLigence®-Daten

Aus dem Versuchsaufbau ergibt sich, dass die Messwerte über eine Zeitreihe aufgenommen wurden. Bei diesen Longitudinaldaten wurde zur Auswertung ein linear gemischtes Modell verwendet. Mit diesem Modell können Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen über eine Zeitreihe ermittelt werden. Dabei wird angenommen, dass es keine Interaktion zwischen den Gruppen und der Zeit gibt und sich die Kurven einer Gruppe somit gleich verhalten. Bei der Auswertung werden feste Effekte und zufällige Effekte berücksichtigt. Die zufälligen Effekte (random intercept) erlauben einen individuellen Kurvenverlauf. Die festen Effekte für die Zeit beschreiben die Mittelwerte des Abfalls oder Anstiegs der Kurven. Untersucht wurde auf einen Unterschied der festen Effekte zwischen PETN-Behandlung und Kontrolle. Die statistische Auswertung der xCELLigence®-Daten mit diesem Modell entstand in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Datenwissenschaften (IMSID) der Universität Jena. P-Werte von  $< 0,05$  wurden als signifikant gewertet.

### 5.2.5 Untersuchung der Endothelfunktion mittels Angiogenese-Assay

Um den Effekt von PETN in einem dreidimensionalen Modell *in vitro* untersuchen zu können, wurden die Endothelzellen auf BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix kultiviert. In der dreidimensionalen Matrix Matrigel™ können Endothelzellen Tubuli ausbilden, weshalb man diese Methode Angiogenese-Assay nennt (Davis und Camarillo 1996, Davis und Senger 2008).

#### 5.2.5.1 Lebendzellfärbung mit Fluoreszenzfarbstoff

Zur besseren Auswertung der Angiogenese-Assays wurden die HUVEC mit grünem Fluoreszenzfarbstoff (CellTracker™ Green CMFDA Dye) gefärbt. Durch Lösung des Farbstoffes in DMSO wurde eine 10 mM Stocklösung hergestellt. Zum Einsatz in der Zellkultur wurde diese 1:1000 mit serumfreiem Medium verdünnt.

Bei Konfluenz einer 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche von nahezu 100 % wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml des in serumfreiem Medium gelösten Farbstoffes für 30

min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden Farbstoff und Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Vor der Verwendung auf Matrigel™ wurde die Zellzahl bestimmt und Zellsuspensionen zu je 160 000 Zellen pro ml Medium hergestellt.

#### 5.2.5.2 Angiogenese-Assay

Für die Angiogenese-Assays wurde das Matrigel™ über Nacht auf Eis aufgetaut und am nächsten Tag je 400 µl Matrigel™ pro Well blasenfrei in die Wells einer nichtadhäsiven 12-Well-Platte (Falcon®-12-Well non-tissue treated Cell Culture Plate) pipettiert. Nach dem anschließenden Aushärten des Gels im Inkubator für 30 min wurden je Well 500 µl Vollmedium zugegeben und das Gel damit über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde das Medium entfernt und pro Well 160 000 HUVEC, die zuvor mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbt worden waren, in 1 ml Medium mit PETN 50 µM oder Kontrolle zugegeben.

Nach 24 h wurde mit dem Olympus-Mikroskop IX-81 mit 40facher Vergrößerung das gebildete dreidimensionale tubuläre Netzwerk fotografiert. Dabei wurde jeweils die Mitte des Wells fokussiert und die aufgenommene Fläche zum späteren Wiederfinden markiert.

Im Anschluss wurde das Medium vorsichtig unter Erhalt der Matrix entfernt und die Tubuli mit Thrombin und PETN oder Kontrolle inkubiert.

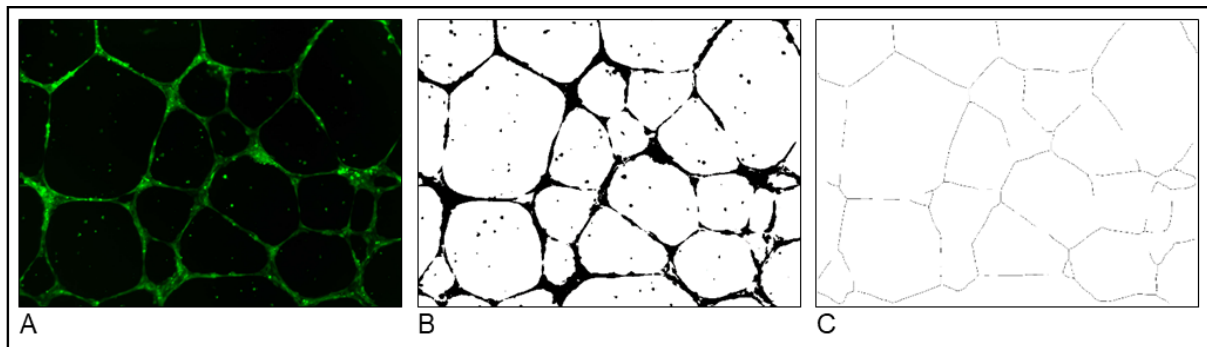
Die anschließenden Fluoreszenzaufnahmen erfolgten an den vorher markierten Stellen 5 min, 10 min, 20 min und 30 min nach der Behandlung.

#### 5.2.5.3 Analyse des tubulären Netzwerkes

Um den Effekt der Behandlung quantifizieren zu können, wurden die Fluoreszenzbilder mit dem Programm ImageJ® ausgewertet.

Das Tool „Angiogenesis Analyzer“ ermöglicht die Analyse der tubulären Strukturen. Dafür mussten die Fluoreszenzbilder zunächst in Bilder mit einer Farbtiefe von 8 bit

und anschließend in Binärbilder umgewandelt werden. Durch die Funktion „Analyze Binary Tree“ wurde das Binärbild vermessen (Abbildung 13).

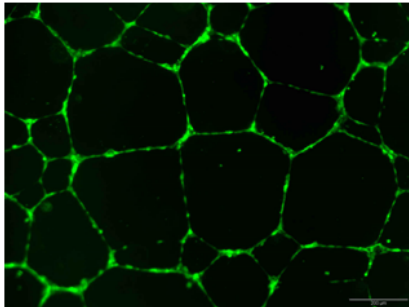
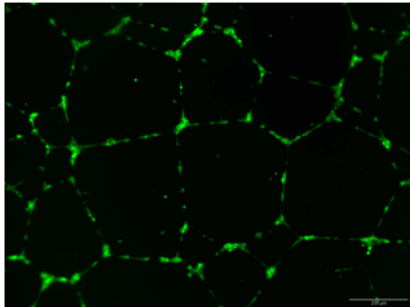




**Abbildung 13 Schema zur Analyse der Fluoreszenzbilder**

Die Aufnahmen der mit Fluoreszenzfarbstoff (CellTracker™ Green CMFDA Dye) gefärbten Endothelzelltubuli (A) wurden mit dem Programm ImageJ® in Binärbilder (B) umgewandelt. Mit dem Tool „Angiogenesis Analyzer“ wurden die Kreuzungsstellen des tubulären Netzes vermessen (C).

Zur Auswertung wurden die ermittelten Werte für die Summe der Kreuzungsstellen („Nodes“) verwendet. Anschließend wurden die Werte für die Bilder nach Behandlung mit den Werten der Bilder vor Behandlung ins Verhältnis gesetzt.



	vor Behandlung	30 min nach Behandlung mit Thrombin 10 U/ml
Fluoreszenzbild		
Binärbild		
Zahl der Kreuzungsstellen	54	8

**Abbildung 14 Endotheliale Tubuli vor und nach Behandlung mit Thrombin**

Vor Behandlung mit Thrombin zeigte sich ein intaktes Netz endothelialer Tubuli mit 54 Kreuzungsstellen. Nach Behandlung mit Thrombin 10 U/ml über 30 min waren Unterbrechungen des Tubulinetzes deutlich sichtbar und die Zahl der Kreuzungsstellen betrug nur noch 8. Für die statistische Auswertung wurde der Quotient aus der Zahl der Kreuzungsstellen nach Behandlung und vor Behandlung gebildet (Ratio = 0,15).

Um einen Unterschied zwischen den Behandlungen mit und ohne PETN ermitteln zu können, wurden in der statistischen Auswertung die PETN-Behandlungen mit den entsprechenden Kontrollen verglichen.

**Tabelle 8 Beispielrechnung zur Auswertung der Angiogenese-Assays**

<b>Behandlung</b>		
	Kontrolle	PETN + Thrombin
DMSO	+	+
BSA	+	+
Thrombin	+	+
PETN	-	+
<b>Zahl der Kreuzungsstellen</b>		
vor Behandlung	54	21
30 min nach Behandlung	8	7
<b>Berechnung der Quotienten</b>		
nach Behandlung/ vor Behandlung	0,15	0,33

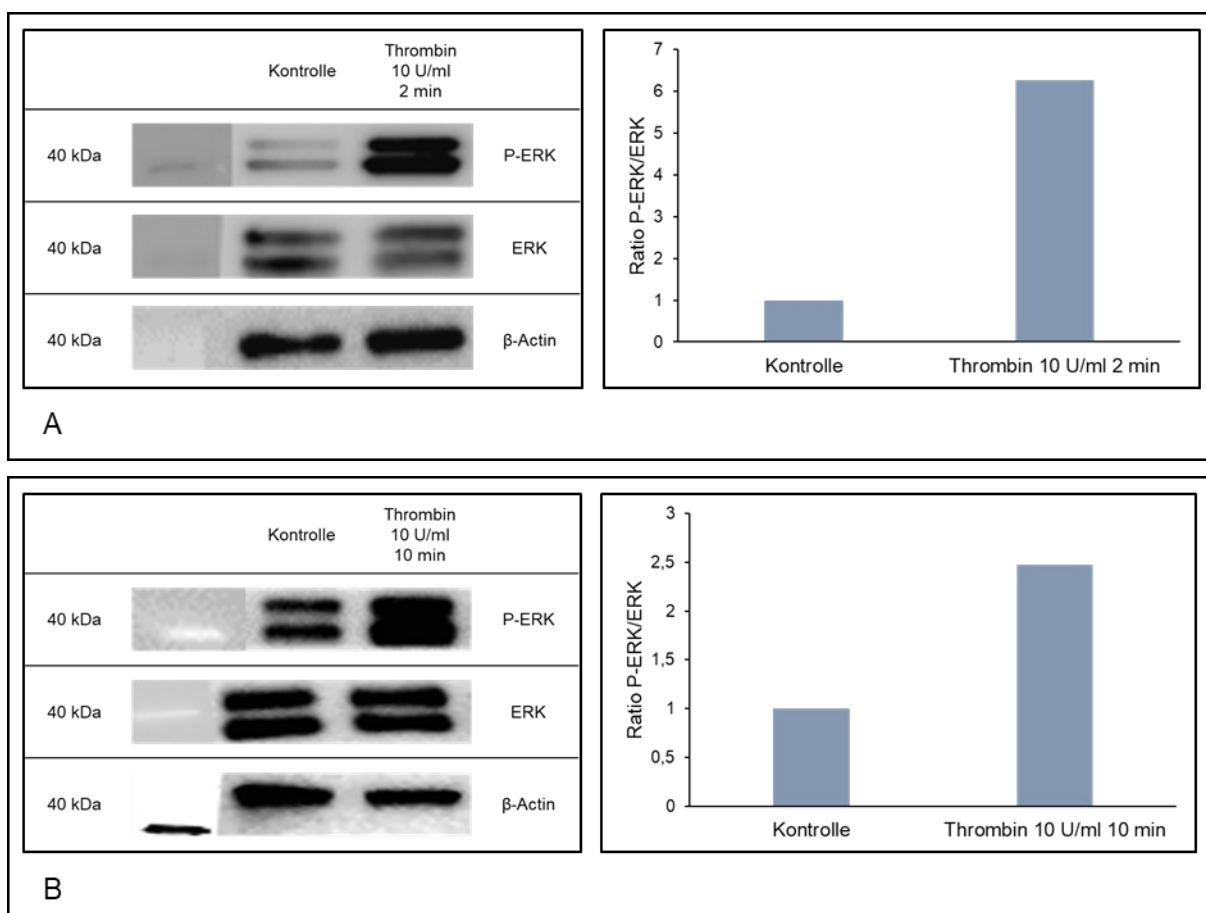
#### 5.2.5.4 Auswertung der Angiogenese-Assays

Auch beim Angiogenese-Assay wurden die Bilder in einem bestimmten Zeitraum ab Behandlungsbeginn zu bestimmten Zeitpunkten longitudinal aufgenommen. Zur Auswertung dieser Longitudinaldaten wurde analog zu den xCELLigence®-Versuchen das linear gemischte Modell angewandt. Damit ist es möglich, Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen über eine Zeitreihe ermitteln zu können. P-Werte von  $< 0,05$  wurden als signifikant gewertet.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Thrombin aktiviert ERK und Akt dosis- und zeitabhängig

Nach Behandlung der HUVEC mit Thrombin in einer Konzentration von 10 U/ml über 2 min und 10 min konnte die Phosphorylierung der ERK im Western Blot nachgewiesen werden.

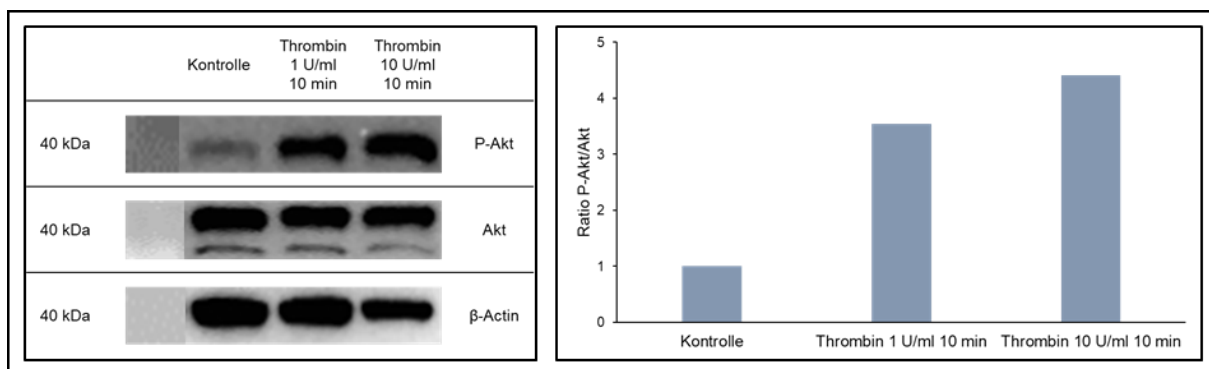


**Abbildung 15 Phosphorylierung der ERK in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit Thrombin**

In der Abbildung sind die mittels Western Blots nachgewiesenen Proteinbanden der ERK (extrazellulär regulierte Kinase) und der phosphorylierten Form von ERK (P-ERK) dargestellt. Die Behandlung mit Thrombin in einer Konzentration von 10 U/ml erfolgte über 2 min und 10 min. Als Kontrolle wurde eine BSA-Lösung in einer Konzentration von 0,1 % verwendet. Es wurden gleiche Proteinmengen eingesetzt. Zur Kontrolle der Proteinmengen wurde zusätzlich  $\beta$ -Actin bestimmt. Die Stärke der Banden wurde mit der Software Alphaview densitometrisch gemessen. Im Western Blot konnte durch die Behandlung der HUVEC mit Thrombin (10 U/ml) über 2 min (A) und 10 min (B) die Phosphorylierung der ERK im Vergleich zur Kontrolle

analysiert werden. Dargestellt sind die Blots und die entsprechenden Balkendiagramme je eines exemplarischen Versuches.

Nach Behandlung der HUVEC mit Thrombin in einer Konzentration von 1 U/ml und 10 U/ml konnte eine dosisabhängige Aktivierung der Akt gezeigt werden. Die Aktivierung der Akt durch Thrombin konnte nicht konstant nachgewiesen werden, daher wurde in den weiteren Versuchen darauf verzichtet den Effekt von PETN auf die Aktivierung der Akt zu untersuchen.

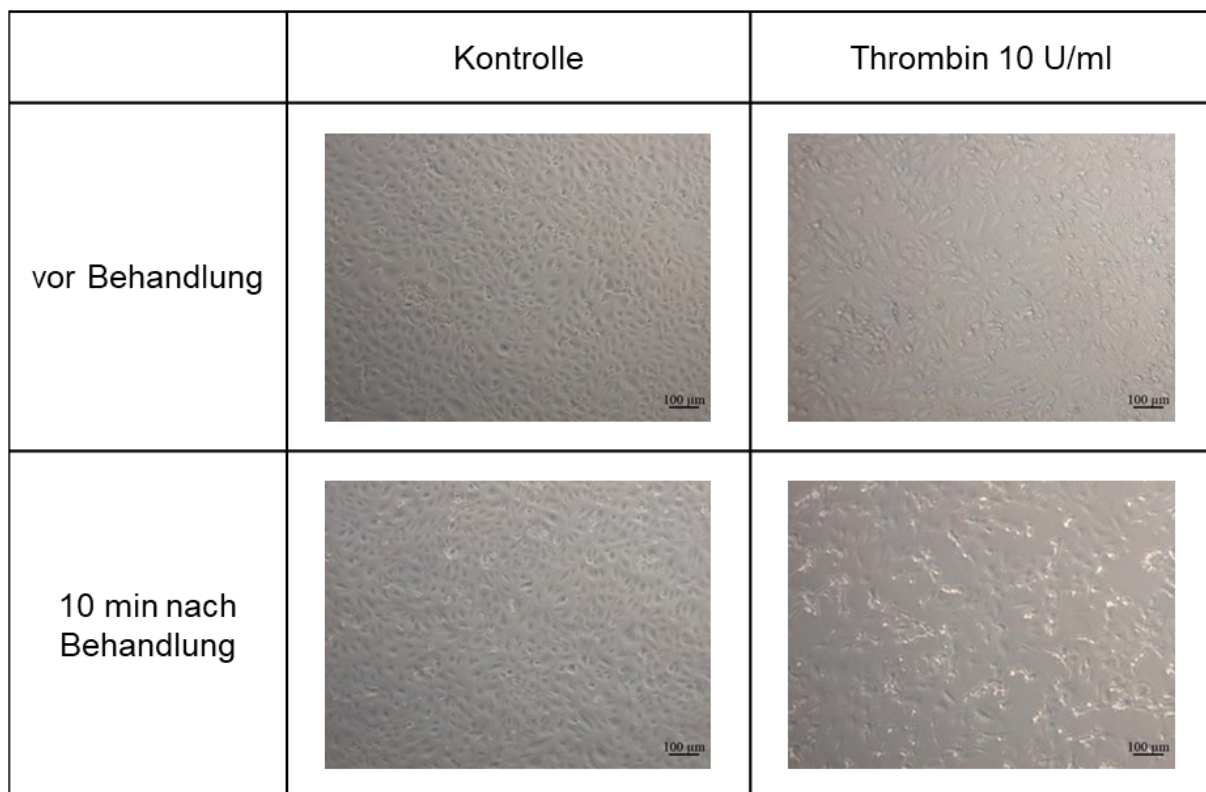


**Abbildung 16 Dosisabhängige Phosphorylierung der Akt nach Stimulation mit Thrombin**

Die immunhistochemische Detektion der Akt und der phosphorylierten Form der Akt (P-Akt) in den HUVEC erfolgte nach Gelelektrophorese und Western Blot. Als Kontrolle wurde eine dem Volumen der höheren Thrombinkonzentration entsprechende 0,1 %ige BSA-Lösung verwendet. Es wurden gleiche Proteinmengen eingesetzt und zur Kontrolle  $\beta$ -Actin bestimmt. Die Stärke der Banden wurde mit der Software Alphaview densitometrisch gemessen. Es zeigte sich eine dosisabhängige Aktivierung der Akt. Durch die Behandlung der HUVEC mit Thrombin in einer Konzentration von 10 U/ml über 10 min konnte mittels Western Blots die stärkste Aktivierung der Akt nachgewiesen werden. Dargestellt sind der Blot und das entsprechende Balkendiagramm eines exemplarischen Versuches.

## 6.2 Desintegration des endothelialen Monolayers durch Thrombin

Lichtmikroskopisch zeigte sich nach Thrombinbehandlung über 10 min eine deutliche Dissoziation der Zellverbände eines HUVEC-Monolayer im Vergleich zur Kontrolle.

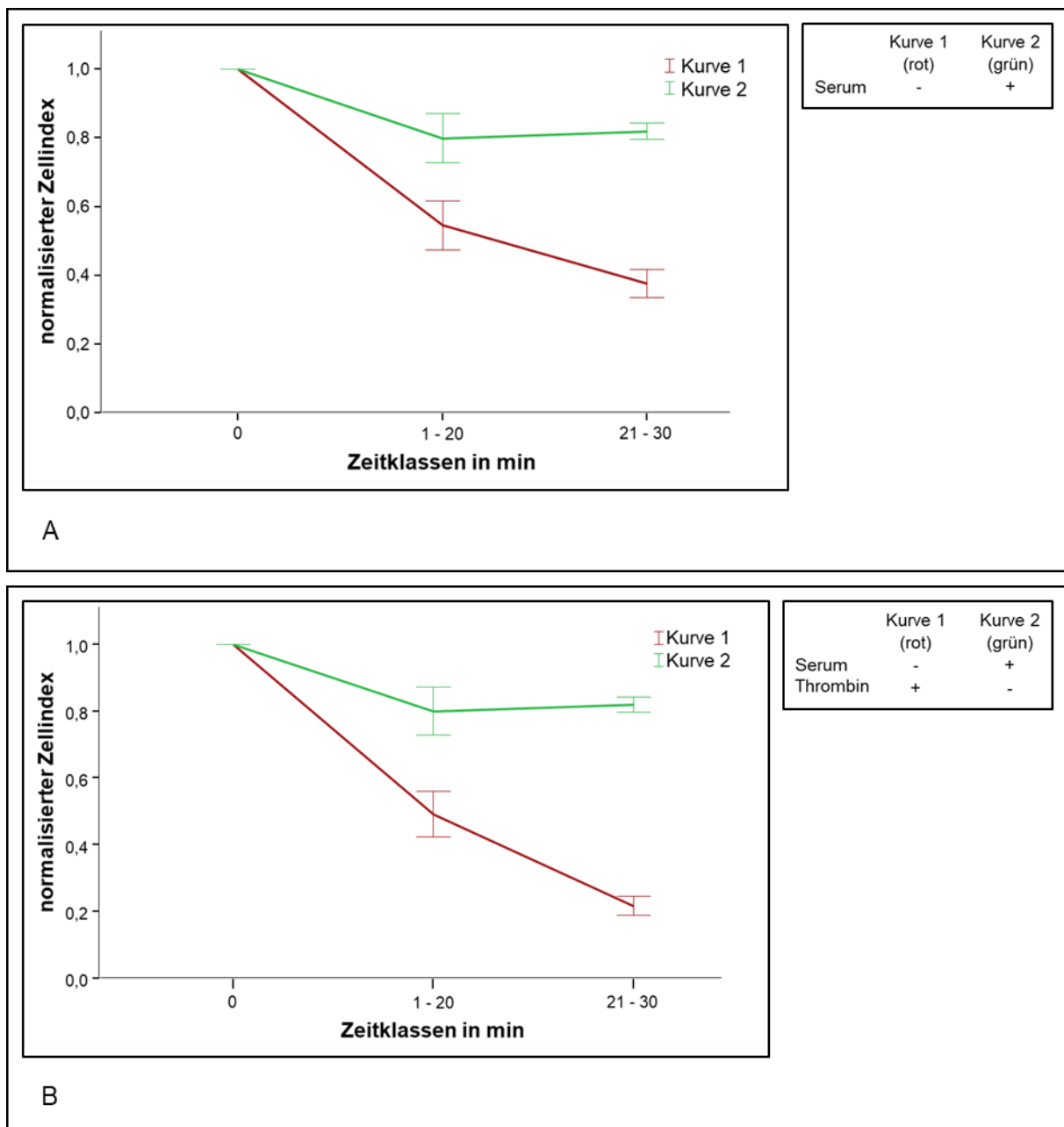


**Abbildung 17 Desintegration des endothelialen Monolayers nach Behandlung mit Thrombin 10 U/ml über 10 min**

Dargestellt sind die Aufnahmen des endothelialen Monolayers vor und nach Behandlung mit Thrombin über 10 min und die entsprechende Kontrolle. Als Kontrolle wurde eine BSA-Lösung in einer Konzentration von 0,1 % verwendet. Nach der Behandlung mit Thrombin zeigte sich eine deutliche Unterbrechung des Monolayers verglichen mit der Aufnahme vor Behandlungsbeginn. Bei der Kontrolle ist keine Veränderung gegenüber der Voraufnahme sichtbar. Die Aufnahmen wurden mit dem Axiovert 25 bei 100facher Vergrößerung durchgeführt.

### **6.3 Störung der endothelialen Barriereintegrität durch Serumentzug und Thrombin**

Im xCELLigence®-System zeigte sich sowohl nach Serumentzug (Abbildung 18 A) als auch nach Behandlung der Endothelzellen mit Thrombin (Abbildung 18 B) ein signifikanter Abfall des normalisierten Zellindex verglichen mit der Inkubation mit Vollmedium (für beide:  $p < 0,0005$ ).

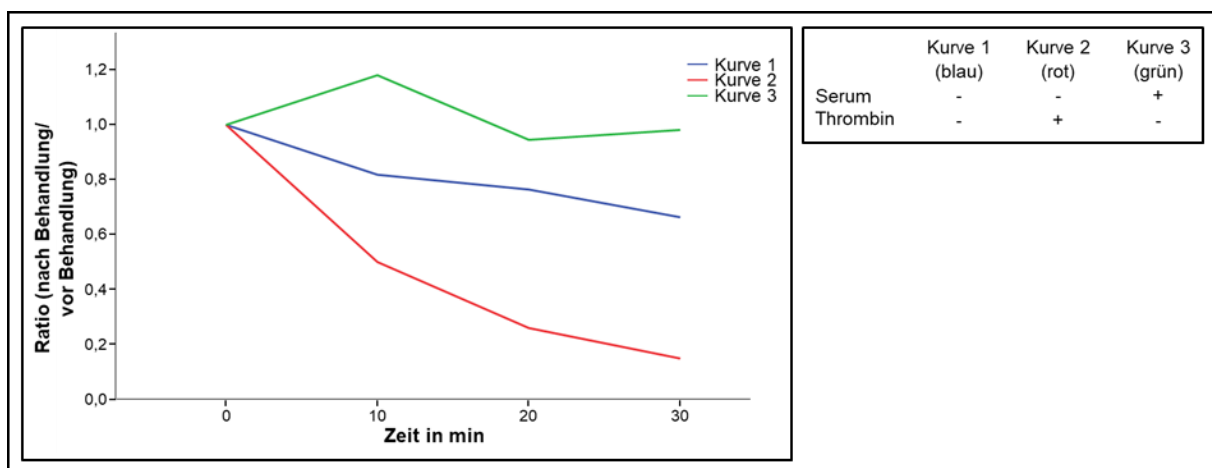


**Abbildung 18 Abfall des normalisierten Zellindex nach Serumentzug und Behandlung mit Thrombin**

In allen Kurven zeigte sich zu Beginn ein Abfall des normalisierten Zellindex, welcher sich bei Inkubation der Zellen in Medium mit Serum (grüne Kurve) im Verlauf stabilisierte. Bei Behandlung mit serumfreiem Medium (A) und mit Thrombin (B) kam es zu einem signifikanten Abfall des normalisierten Zellindex verglichen mit einem alleinigen Wechsel des Mediums (für beide Diagramme:  $p < 0,0005$ ). Bei Behandlung mit Thrombin fiel der normalisierte Zellindex deutlich stärker als bei Behandlung mit serumfreiem Medium. Die Kurven zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen von sieben unabhängigen Versuchen.

## 6.4 Dissoziation endothelialer Tubuli durch Serumentzug und Behandlung mit Thrombin

Ein reiner Mediumwechsel führte im Angiogenese-Assay zu einer leichten Zunahme der Kreuzungsstellen, die im weiteren Verlauf stabil blieben. Nach Serumentzug und Behandlung mit Thrombin kam es zu einer Reduktion der Kreuzungsstellen. Die Behandlung mit Thrombin führte dabei zu einer deutlich stärkeren Abnahme als der Serumentzug allein. Daher wurde im Angiogenese-Assay der Effekt von PETN auf die Wirkung von Thrombin untersucht.



**Abbildung 19** Reduktion der Kreuzungsstellen der Tubuli nach Serumentzug und Behandlung mit Thrombin

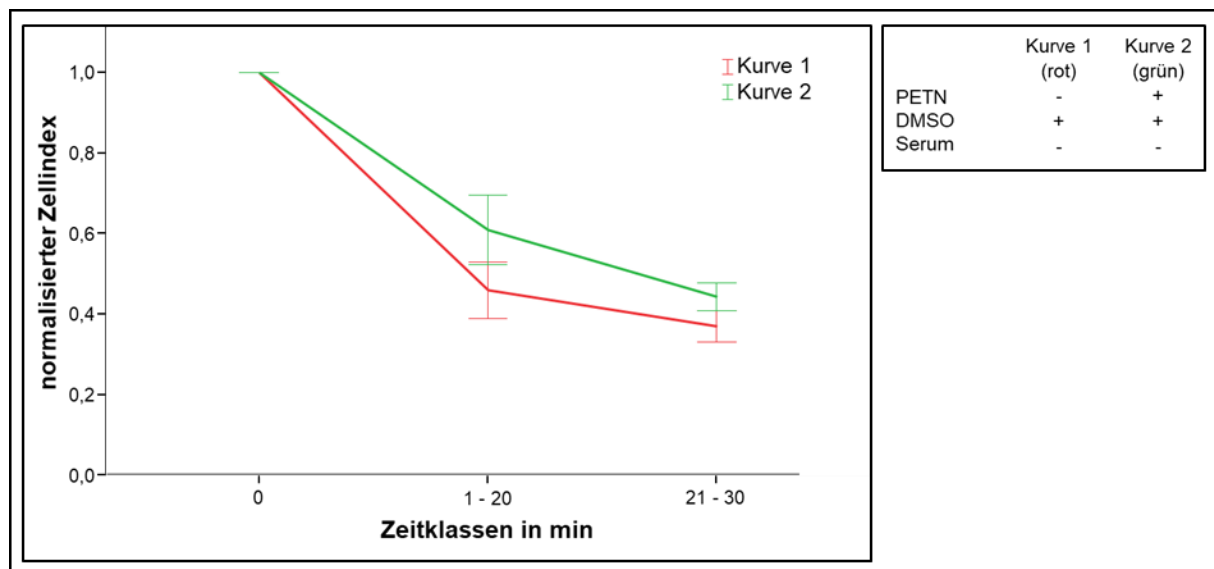
In der Abbildung ist die Abnahme der Kreuzungsstellen nach Serumentzug (blaue Kurve) und Behandlung mit Thrombin (rote Kurve) verglichen mit einem alleinigen Wechsel des Mediums (grüne Kurve) dargestellt. Bei Wechsel des Vollmediums blieb die Zahl der Kreuzungsstellen stabil. Bei Serumentzug und Behandlung mit Thrombin nahm die Zahl der Kreuzungsstellen ab. Bei Behandlung mit Thrombin ist die Abnahme über die Zeit deutlich stärker als bei Serumentzug. Dargestellt sind die Kurven eines exemplarischen Versuches.

## 6.5 PETN reduzierte den Effekt von Serumentzug und Thrombin auf die Barriereintegrität

### 6.5.1 PETN reduzierte den Effekt von Serumentzug auf die Barriereintegrität

Nach Serumentzug zeigte sich bei PETN-Vorbehandlung ein signifikant geringerer Abfall des normalisierten Zellindex als bei der Kontrolle. In der Tabelle 9 und der

Abbildung 20 ist zu sehen, dass der normalisierte Zellindex bei der Kontrolle um 0,31 Prozentpunkte pro Minute stärker fiel als bei PETN ( $p = 0,003$ ).



**Abbildung 20 Abfall des normalisierten Zellindex nach Serumentzug in Abhängigkeit von PETN**

Bei Behandlung der Endothelzellen mit PETN zeigte sich ein geringerer Abfall des normalisierten Zellindex nach Serumentzug ( $p = 0,003$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von acht unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung wurde mittels des linear gemischten Modells durchgeführt.

**Tabelle 9 Effekt von PETN auf die durch Serumentzug induzierte Störung der Barriereintegrität**

Dargestellt sind die geschätzten Veränderungen des normalisierten Zellindex bei Behandlung mit PETN und Kontrolle sowie der geschätzte Effekt für den Unterschied der Behandlungen. Bei Vorbehandlung der HUVEC mit PETN fiel der normalisierte Zellindex um 0,31 Prozentpunkte pro Minute weniger stark als bei der Kontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des linear gemischten Modells ( $n = 8$ ).

Geschätzter Abfall des normalisierten Zellindex bei PETN + Serumentzug	Geschätzter Abfall des normalisierten Zellindex der Kontrolle	Unterschied von PETN und Kontrolle	Konfidenzintervall (95 %)	p-Wert
- 0,023457	- 0,026542	0,003085	0,001058 – 0,005112	0,003



### 6.5.2 PETN reduzierte den Effekt von Thrombin auf die Barriereintegrität

Nach Vorbehandlung mit PETN kam es bei Behandlung mit Thrombin zu einem signifikant geringeren Abfall des normalisierten Zellindex. Wie in Tabelle 10 und Abbildung 21 dargestellt fiel der normalisierte Zellindex bei der Kontrolle um 0,28 Prozentpunkte pro Minute stärker als bei der PETN-Behandlung ( $p = 0,014$ ).



**Abbildung 21** Abfall des normalisierten Zellindex durch Behandlung mit Thrombin in Abhängigkeit von PETN

Bei Behandlung der Endothelzellen mit PETN zeigte sich ein signifikant geringerer Abfall des normalisierten Zellindex nach Thrombinbehandlung ( $p = 0,014$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von acht unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung wurde mittels des linear gemischten Modells durchgeführt.

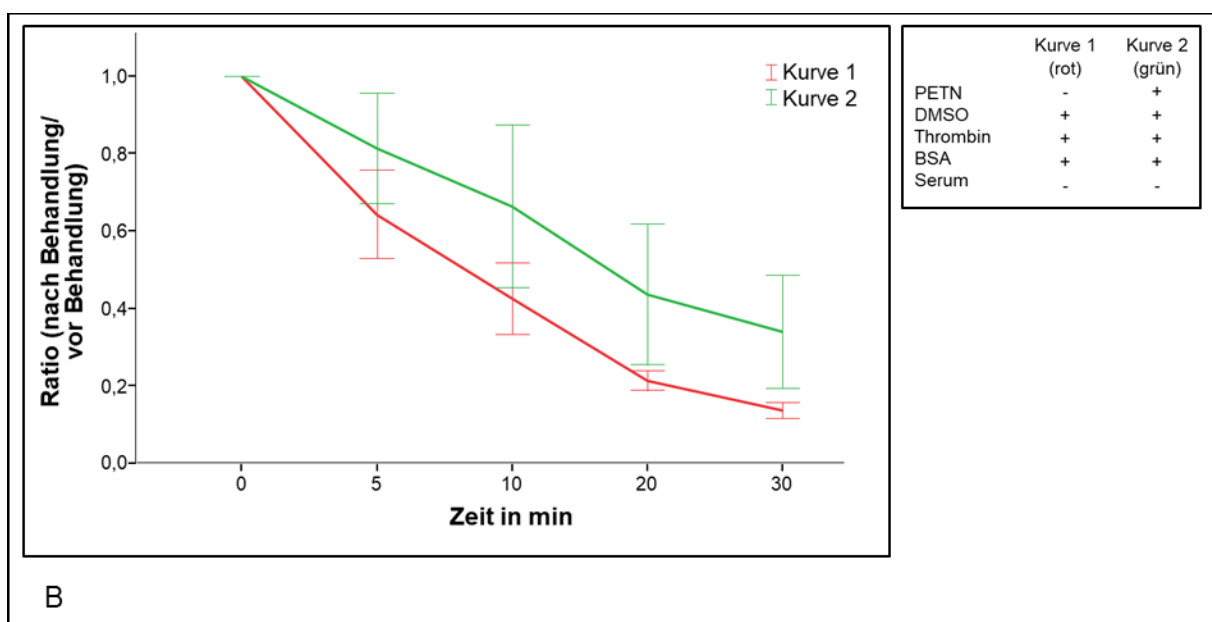
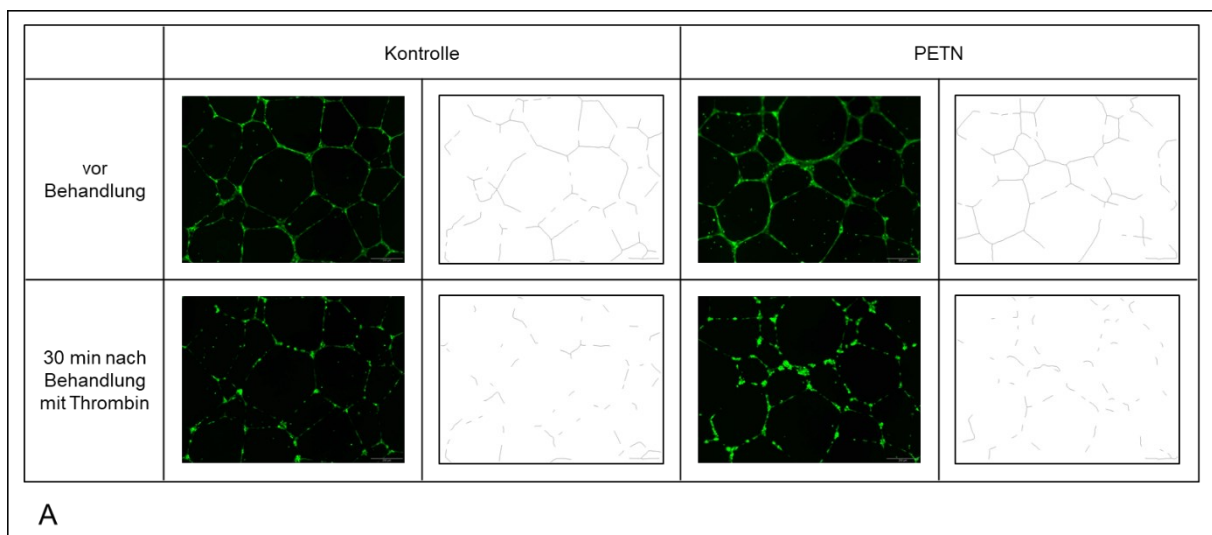
**Tabelle 10** Effekt von PETN auf die durch Thrombin induzierte Störung der Barriereintegrität

Dargestellt sind die geschätzten Parameter für den Abfall des normalisierten Zellindex bei PETN und Kontrolle sowie der geschätzte Parameter für den Unterschied beider Behandlungen. Bei Vorbehandlung der HUVEC mit PETN fiel der normalisierte Zellindex um 0,28 Prozentpunkte pro Minute weniger stark als bei der Kontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des linear gemischten Modells ( $n = 8$ ).

Geschätzter Abfall des normalisierten Zellindex bei PETN + Thrombin	Geschätzter Abfall des normalisierten Zellindex der Kontrolle	Unterschied von PETN und Kontrolle	Konfidenzintervall (95 %)	p-Wert
- 0,028966	- 0,031792	0,002826	0,000584 – 0,005068	0,014

## 6.6 Erhöhung der Stabilität endothelialer Tubuli durch PETN

Nach PETN-Behandlung verlief die Abnahme der Kreuzungsstellen signifikant langsamer als bei der Kontrolle. In der Abbildung 22A sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Tubulinetzes vor und nach Behandlung mit Thrombin bei PETN und Kontrolle dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei PETN die Reduktion der Kreuzungsstellen langsamer verlief und nicht so stark ausgeprägt war wie bei der Kontrolle. In der Tabelle 11 ist zu sehen, dass die Zahl der Kreuzungsstellen bei der Kontrolle um 0,97 Prozentpunkte stärker fiel als bei PETN ( $p = 0,027$ ).



## Abbildung 22 Reduktion der Kreuzungsstellen durch Thrombin in Abhängigkeit von PETN

Nach Inkubation der mit grünem Fluoreszenzfarbstoff gefärbten HUVEC auf Matrigel™ für 24 h wurden die ausgebildeten Tubuli mittels Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Auf den Aufnahmen 30 min nach Behandlung mit Thrombin zeigte sich bei Vorbehandlung mit PETN eine geringere Unterbrechung des Tubulinetzes als bei der Kontrolle. Gezeigt sind die Fluoreszenzbilder und die entsprechenden Binärbilder (A). Die Zahl der Kreuzungsstellen wurde mit dem ImageJ® Angiogenesis Analyzer quantifiziert und anschließend die Werte nach Behandlung mit denen vor Behandlung ins Verhältnis gesetzt. Bei Vorbehandlung mit PETN zeigte sich ein signifikant geringerer Abfall der Kreuzungsstellen ( $p = 0,027$ ). Die Kurven stellen die Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten dar. Die statistische Auswertung wurde mittels des linear gemischten Modells durchgeführt (B).

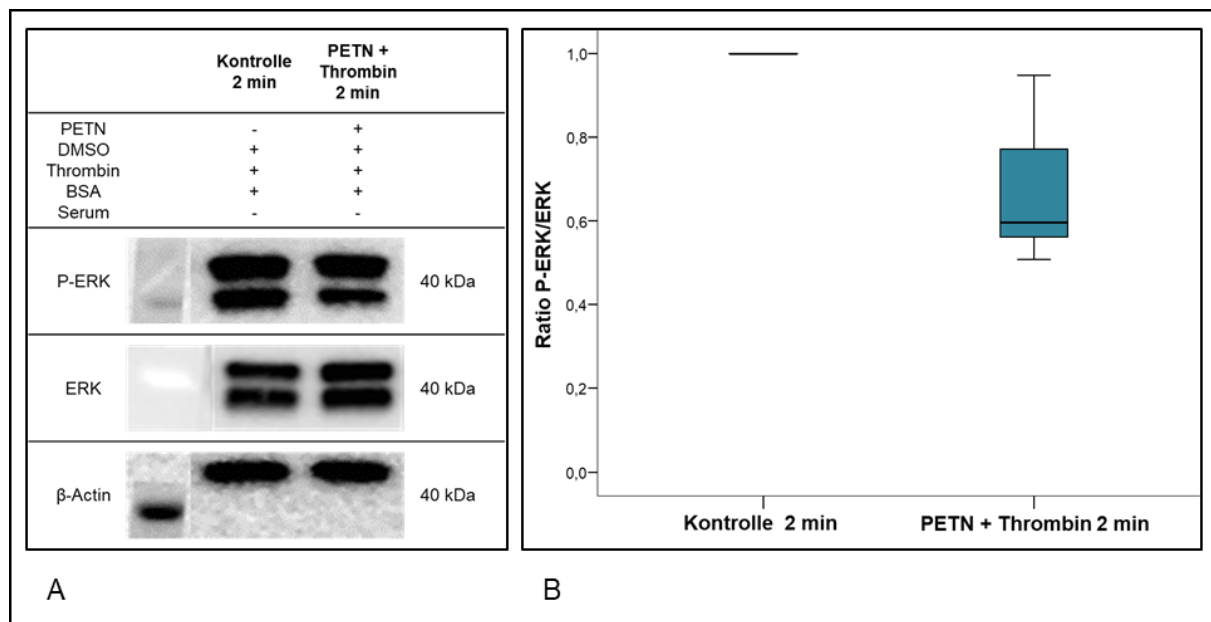
## Tabelle 11 Effekt von PETN auf die durch Thrombin induzierte Reduktion der Kreuzungsstellen

Dargestellt sind die geschätzten Parameter für den Abfall der Kreuzungsstellen bei Behandlung mit PETN und Kontrolle sowie der geschätzte Parameter für den Unterschied der Behandlungen. Bei Vorbehandlung mit PETN nahm die Zahl der Kreuzungsstellen um 0,97 Prozentpunkte pro Minute weniger stark ab als bei der Kontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des linear gemischten Modells ( $n = 3$ ).

Geschätzter Abfall der Kreuzungsstellen bei PETN + Thrombin	Geschätzter Abfall der Kreuzungsstellen der Kontrolle	Unterschied von PETN und Kontrolle	Konfidenzintervall (95 %)	p-Wert
- 0,019515	- 0,029184	0,009669	0,001188 – 0,018151	0,027

## 6.7 Abschwächung der Phosphorylierung der ERK nach Thrombinbehandlung über 2 min durch Vorbehandlung mit PETN

Bei Vorbehandlung der HUVEC mit PETN 50  $\mu$ M über 24 h zeigte sich nach Thrombinbehandlung 10 U/ml über 2 min eine signifikant geringere Aktivierung der ERK im Western Blot ( $p = 0,008$ ). Es kam zu einer Reduktion der Phosphorylierung der ERK um 40 %.

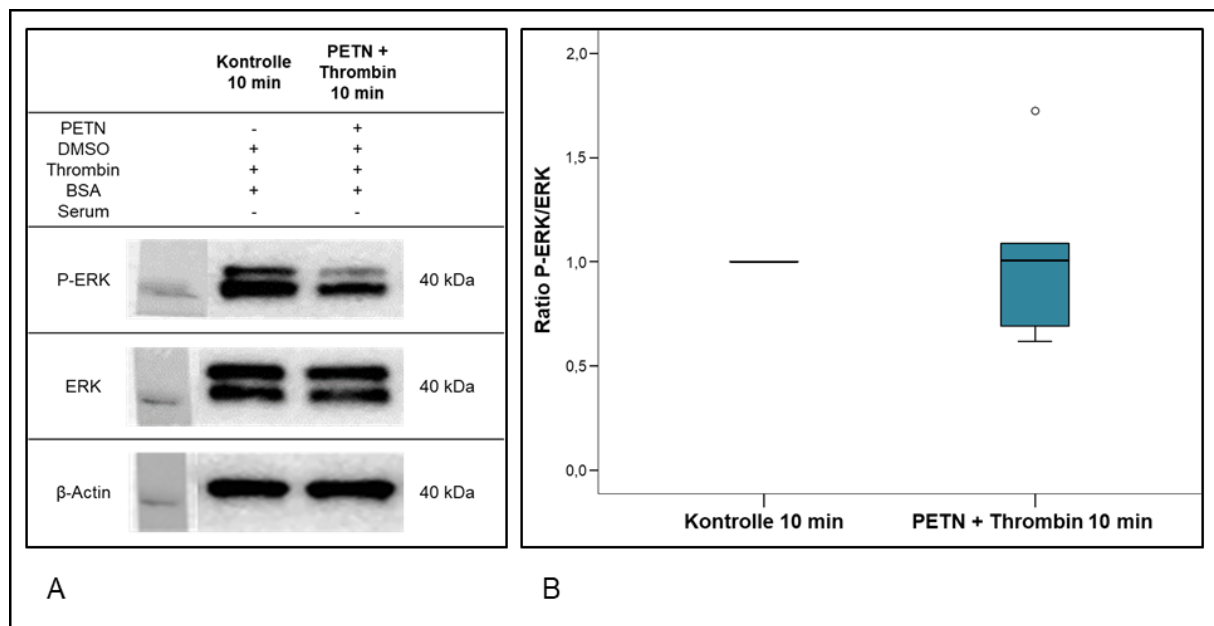


**Abbildung 23 Expression der ERK und P-ERK nach Vorbehandlung mit PETN 50 µM über 24 h und anschließender Stimulation mit Thrombin 10 U/ml für 2 min**

Dargestellt sind die Proteinbanden eines exemplarischen Western Blots aus fünf Versuchen. Es wurden gleiche Proteinmengen eingesetzt und zur Kontrolle  $\beta$ -Actin bestimmt. Als Kontrolle für Thrombin wurde eine BSA-Lösung in einer Konzentration von 0,1 % und als Kontrolle für PETN wurde DMSO verwendet (A). Die Stärke der Banden wurde mit der Software Alphaview densitometrisch bestimmt. Im Boxplot sind Median und Interquartilsabstand der Ratio P-ERK zu ERK der Thrombinbehandlungen dargestellt ( $n = 5$ ). Bei einer Vorbehandlung mit PETN zeigte sich eine signifikant geringere Expression der P-ERK verglichen mit der Kontrolle ( $p = 0,008$ ). Der Median bei Vorbehandlung mit PETN ist geringer und liegt bei PETN bei 0,60 und bei der Kontrolle bei 1,00. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (B).

## 6.8 Nach 10 min zeigte sich keine Änderung der thrombininduzierten Phosphorylierung der ERK durch PETN

Die Phosphorylierung der ERK bei Thrombinbehandlung über 10 min wurde nicht durch PETN beeinflusst ( $p = 0,69$ ).



**Abbildung 24 Expression der ERK und P-ERK nach Stimulation mit PETN 50  $\mu$ M über 24 h und anschließender Behandlung mit Thrombin 10 U/ml für 10 min**

Dargestellt sind die Proteinbanden eines exemplarischen Western Blots aus fünf Versuchen. Es wurden gleiche Proteinmengen eingesetzt und zur Kontrolle  $\beta$ -Actin bestimmt (A). Die Stärke der Banden wurde mit der Software Alphaview densitometrisch bestimmt. Im Boxplot sind Median und Interquartilsabstand der Ratio P-ERK zu ERK der Thrombinbehandlungen dargestellt ( $n = 5$ ). PETN hatte keinen Effekt auf die Phosphorylierung der ERK bei einer Thrombinbehandlung über 10 min ( $p = 0,69$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Der Kreis im Boxplot markiert einen Ausreißer (B).

## 7 Diskussion

### 7.1 Methodendiskussion

#### 7.1.1 Zellkultur

Um die Wirkung von PETN auf Endothelzellen untersuchen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Zellkulturmodell angewandt. Zellkulturmodelle haben in der Forschung einen hohen Stellenwert, da sie sich standardisieren lassen (Schmitz 2011). Dadurch sind die Ergebnisse der verschiedenen Experimente untereinander gut vergleichbar.

Für die Zellkultur wurden gepoolte primäre Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene verwendet. Die gepoolten Zellen stammen aus bis zu vier verschiedenen Nabelschnüren. Dadurch ergibt sich verglichen mit einer Zelllinie ein unterschiedlicher genetischer Ursprung. Durch den unterschiedlichen genetischen Ursprung wird der Einfluss der genetischen Herkunft einer Zelle reduziert.

Die Primärkultur kommt im Vergleich zu immortalisierten Zelllinien den gegebenen Bedingungen im Organismus insofern nah, als die Zellen in ihren Eigenschaften *in vitro* zunächst nicht verändert werden. Jedoch sind primäre Zellen nicht unbegrenzt kultivierbar und es kann es im Verlauf zu Änderungen der Zelleigenschaften kommen (Schmitz 2011). Um zu verhindern, dass diese Veränderungen sich auf die Ergebnisse auswirken, wurden die Zellen nur bis zur Passage zehn verwendet. Zur Vermeidung interexperimenteller Unterschiede wurden für alle Versuche Endothelzellen derselben Primärzellkultur genutzt.

Da die Nabelschnur nach der Geburt nicht mehr benötigt wird, kann Gewinnung und Kultivierung der HUVEC ohne Schädigung am Menschen geschehen (Lei et al. 2016). Endothelzellen der Nabelschnurvene sind leicht verfügbar und deshalb zur Untersuchung vaskulärer Erkrankungen und insbesondere der endothelialen Dysfunktion weltweit etabliert (Andrikopoulos et al. 2015, Jia et al. 2017).

### 7.1.2 Proteinnachweis im Western Blot

Der Western Blot ermöglicht den Vergleich der Expression der Menge spezifischer Proteine, deren Phosphorylierungszustand oder anderer Veränderungen in unterschiedlichen Proben durch den Einsatz gleicher Proteinmengen. Auf Proteinebene sollte in dieser Arbeit die Phosphorylierung der ERK durch Thrombin und die Abschwächung dieses Effektes durch PETN mittels Western Blots nachgewiesen werden.

Für diese Arbeit wurde zunächst der Western Blot zum Nachweis der HO-1 etabliert. Dazu wurde die Expression der HO-1 mit verschiedenen Konzentrationen des direkten Aktivator Cobalt-(III)-Protoporphyrin-(IX)-chlorid gesteigert und anschließend die unterschiedlich starke Expression von HO-1 im Western Blot nachgewiesen. Dies gelang problemlos und im nächsten Schritt sollte dann der Nachweis einer Aktivierung der HO-1 durch PETN erfolgen. Bei Behandlung der Endothelzellen mit PETN in einer Konzentrationsreihe von 5  $\mu\text{M}$  bis 1000  $\mu\text{M}$  waren bei den PETN-Konzentrationen über 100  $\mu\text{M}$  lichtmikroskopisch viele tote Zellen zu beobachten, sodass diese Proben nicht für den Western Blot verwendet wurden. Als ursächlich für das Sterben der Zellen wird die Menge des in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirkenden DMSO vermutet, in welchem das PETN gelöst ist. Bei niedrigeren PETN-Konzentrationen wurde kein Zellsterben beobachtet. Es gelang der Nachweis der HO-1 beim Einsatz von 5  $\mu\text{g}$  Protein.

In der Arbeitsgruppe war der Nachweis der ERK und der P-ERK bereits etabliert und konnte nach den entsprechenden Protokollen durchgeführt werden. Dabei wurden im ersten Experiment Proteinmengen von 5  $\mu\text{g}$  und 10  $\mu\text{g}$  eingesetzt. Da beim Einsatz von 5  $\mu\text{g}$  Protein die Banden gut detektierbar waren, wurde diese Menge in den weiteren Versuchen verwendet.

Bei der Detektion der Proteine mittels ChemiBIS® wurden anfangs die Belichtungseinstellungen variiert, wobei eine gute Darstellung der Banden bei einer Belichtungszeit von 1 min gelang. Um die Ergebnisse der Western Blots untereinander vergleichen zu können, wurden für alle Versuche die gleichen Aufnahmeeinstellungen genutzt.

Der Einsatz gleicher Proteinmengen wurde durch die Detektion von  $\beta$ -Actin überprüft. Da  $\beta$ -Actin, ERK und P-ERK ein ähnliches Molekulargewicht haben (~40 kDa), mussten die Antikörper zwischen den Detektionen von den Membranen entfernt (= gestrippt) werden.

Durch eine größere Wiederholungszahl der Versuche könnte der Einfluss von methodischen Fehlern minimiert werden und somit ein signifikanter Effekt entstehen. Weitere Wiederholungen waren im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht realisierbar.

### **7.1.3 xCELLigence®-Versuche**

Mit den xCELLigence®-Versuchen sollte die Integrität des endothelialen Monolayers gegenüber Serumentzug und einer Behandlung mit Thrombin untersucht werden. Es wurde bereits gezeigt, dass Thrombin zu einer Erhöhung der Permeabilität führt (Konstantoulaki et al. 2003, Xie et al. 2016). Dies stellt sich in einem Einbruch der Impedanz im xCELLigence®-System dar.

Das xCELLigence®-System ermöglicht die Echtzeitanalyse der Integrität des endothelialen Monolayers. Ab Messbeginn erfolgt eine kontinuierliche Messung der Impedanz. Durch die Proliferation der HUVEC kommt es zu einer Zunahme der Impedanz, was einer Zunahme der Dichtigkeit des Monolayers entspricht. Da Endothelzellen als Monolayer wachsen, ist die Messung der Impedanz ein indirektes Maß für die Proliferation der Endothelzellen. Die Untersuchung der Barriereintegrität in Abhängigkeit von einer Behandlung ist eine klassische Anwendung des xCELLigence®-Systems (Kustermann et al. 2014). Da die Messung kontinuierlich über die Zeit erfolgt, ist der Effekt der Behandlung unmittelbar sichtbar.

Analog zu den anderen Experimenten sollte die Vorbehandlung der HUVEC mit PETN über 24 h erfolgen. Nach 24 h sollten die Endothelzellen die Plateauphase erreicht haben, um in der anschließenden Behandlung eine Aussage über die Veränderung der Dichte treffen zu können. Daher wurde in einem Vorexperiment die Proliferation der HUVEC in Abhängigkeit von der Zellkonzentration über mehrere Tage untersucht und auf Grundlage dieses Versuches für alle weiteren eine Zellzahl von 10 000 HUVEC pro Well eingesetzt.



Nach 24 h Inkubation wurde die Behandlung durchgeführt. Dies geschah unabhängig von dem erreichten Zellindex. Dadurch können zu Beginn eines Experimentes bei verschiedenen Versuchen unterschiedliche Zellindex-Werte und somit eine unterschiedliche Dichte vorgelegen haben. Dies lässt sich auf Probleme in der Adhäsion und Proliferation der HUVEC zurückführen und kann eventuell bei höherer Passage auftreten.

Betrachtet man nur die Zellindex-Werte, kann es aufgrund unterschiedlicher Zellindex-Werte in unterschiedlichen Zellkulturwells zu Beginn einer jeweiligen Messreihe und während einer Messreihe zu Fehlinterpretationen im Vergleich der gemessenen Veränderungen kommen. Wenn beispielweise zwei Kurven mit unterschiedlichem Zellindex zu Beginn sich zu einem späteren Zeitpunkt schneiden würden, wäre der absolute Zellindex-Wert gleich, der Abfall des Zellindex und somit die Änderung der Dichte jedoch unterschiedlich.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde der normalisierte Zellindex verwendet. Dabei werden die absoluten Zellindex-Werte auf den Zellindex vor Behandlungsbeginn standardisiert und somit der Abfall des Zellindex betrachtet.

Die Untersuchung des Zellverhaltens mit dem xCELLigence®-System ist bisher nicht weit verbreitet und die Darstellung der Ergebnisse in der Literatur nicht standardisiert. Zur Untersuchung der Veränderung der Zellfunktion nach Zugabe eines Medikamentes wird von der Herstellerfirma Acea Biosciences der normalisierte Zellindex empfohlen (AceaBiosciences 2013).

Es ist gezeigt, dass die Störung der endothelialen Barriere durch Thrombin innerhalb von Minuten einsetzt und etwas mehr als 60 Minuten anhält (Konstantoulaki et al. 2003). Das schnelle Einsetzen der Wirkung konnte in den hier durchgeführten Versuchen bestätigt werden und muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Wie in den Methoden beschrieben, konnten mit dem xCELLigence®-System in den ersten Minuten direkt nach Behandlungsbeginn keine Messwerte aufgenommen werden. Außerdem kam es durch die Temperaturveränderung und den Mediumwechsel zur Auslösung eines gewissen Zellstress und möglicherweise fand

auch eine Manipulation des Monolayers beim Absaugen oder der Zugabe des neuen Mediums statt. Bereits durch diese methodischen Einflüsse kann es zu einer Änderung der Impedanz gekommen sein. Entsprechend ist der unmittelbar nach jedem Mediumwechsel gemessene Abfall des normalisierten Zellindex als Artefakt zu betrachten.

Bei den ersten Versuchen wurde für die Zeit nach dem Mediumwechsel ein Messintervall von 5 min gewählt, da geplant war, die Versuche über 2 h auszuwerten und ein kleineres Messintervall zu einer deutlich größeren Menge an Daten pro Versuch führen würde.

Bei der Auswertung der Graphen wurden Unterschiede zwischen den Kurven insbesondere zu Beginn der Behandlung beobachtet. Daher wurden in die Auswertung zuletzt nur die Werte bis 30 min nach Behandlungsbeginn einbezogen.

Für diesen Zeitraum ergaben sich allerdings durch das Messintervall von 5 min vergleichsweise wenig Messwerte. Um das Verhalten der Kurven über diesen Zeitraum genauer untersuchen zu können, wurden in drei weiteren Versuchen die Messwerte im Minutentakt aufgenommen.

#### **7.1.4 Angiogenese-Assay**

*In vivo* werden Wachstum und Differenzierung der Zellen maßgeblich von der extrazellulären Matrix beeinflusst (Fitzgerald et al. 2015). Durch die Verwendung der extrazellulären Matrix in der Zellkultur kann die physiologische Situation *in vivo* besser nachempfunden werden (LaMarca et al. 2005, Pampaloni et al. 2007).

In der Literatur ist unter anderem zur Untersuchung der Präeklampsie, des Verhaltens von Karzinomen und zur Forschung an Medikamenten die 3D-Kultur auf Matrigel™ etabliert (Benton et al. 2014, Fitzgerald et al. 2015, Multhaup et al. 2018, von Versen-Hoyneck et al. 2014).

Matrigel™ ist eine der Basalmembran ähnliche Matrix, die aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkom der Maus stammt und reich ist an extrazellulären Matrixproteinen wie Laminin, Kollagen IV und Entactin (Hughes et al. 2010). Die Matrix erlaubt den HUVEC

die Ausbildung kapillarartiger Tubuli (DeCicco-Skinner et al. 2014, Grant et al. 1989, Kleinman und Martin 2005). Dieser Prozess wird daher mit einer Angiogenese *in vitro* gesetzt.

Eine Störung der Tubulibildung ist Hinweis auf eine endotheliale Dysfunktion. Daher wurde das Angiogenese-Assay als *in-vitro*-Modell zur Untersuchung des Effektes von PETN auf die endotheliale Dysfunktion verwendet.

Um die Aufnahmen nach Behandlung mit den Aufnahmen vor Behandlung vergleichen zu können, war es nötig die Aufnahmen an der gleichen Stelle im Well durchzuführen. Daher sollten die Aufnahmen mit einem Mikroskop mit automatisiertem Tisch erfolgen. Jedoch konnte in den verschiedenen Wells durch das Matrigel™ kein einheitlicher Fokus definiert werden, sodass unscharfe Aufnahmen entstanden und die Aufnahmen nicht automatisiert erfolgen konnten. Daher mussten die Ausschnitte im Well visuell wiedergefunden und fokussiert werden. Für die Durchführung der Fluoreszenzaufnahmen wurde das Olympus-Mikroskop vom Typ IX 81 verwendet.

Analog zu den anderen beschriebenen Versuchen in dieser Arbeit erfolgten die Beobachtung und die Aufnahmen der Tubuli über 30 min ab Behandlungsbeginn. Die Aufnahmen erfolgten 5 min, 10 min, 20 min und 30 min nach dem Behandlungsbeginn mit dem Stressor. Häufigere Aufnahmen waren aufgrund der Methodik nicht realisierbar.

Zur Analyse des Effektes von PETN auf die Stabilität der Tubuli, war eine Quantifizierung der ausgebildeten Tubuli nötig. In der Literatur ist zur Auswertung von Angiogenese-Assays die Quantifizierung der Kreuzungsstellen als Maß für den angiogenetischen Effekt mittels ImageJ® (Carpentier 2012) beschrieben (Benton et al. 2014, Blackburn und Brinckerhoff 2008, DeCicco-Skinner et al. 2014). Analog dazu wurde in dieser Arbeit die Zahl der Kreuzungsstellen mittels ImageJ® bestimmt.

Für die automatisierte Quantifizierung der Kreuzungsstellen mussten die Endothelzellen gefärbt werden. Dies stellte für die Zellen zwar einen zusätzlichen Stressreiz dar, war aber für die Auswertung unabdingbar, da Tubuli ungefärbter Zellen durch das Programm nicht zuverlässig erkannt wurden.

## 7.2 Ergebnisdiskussion

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die Vorbehandlung mit PETN zu einer Abmilderung der Stressreaktion bei Endothelzellen führt. Dies konnte in funktionellen Untersuchungen bestätigt werden. Es wurde eine geringere Störung der Barriereintegrität und eine geringere Abnahme der Kreuzungsstellen der Tubuli nachgewiesen. Zusätzlich weisen die Veränderungen des Aktivierungszustandes eines Signaltransduktionsmoleküls auf eine Beteiligung der ERK an dieser Wirkung von PETN hin.

Die Erhöhung der Resistenz des Endothels gegenüber Stressoren verbessert die vaskuläre Gesundheit und kann so die klinische Besserung von Symptomen bei Präeklampsie sowie die Abmilderung des Schweregrades einer IUGR begründen. Durch die Stabilisierung der Barriereintegrität und der Dysfunktion können Symptome der Präeklampsie wie Ödeme und Hypertonie reduziert werden. Gleichzeitig werden die plazentare Durchblutung und damit die Versorgung des Feten verbessert und so das Fortschreiten der Plazentainsuffizienz und ihrer Folgen abgemildert.

### 7.2.1 Wie verursachen Thrombin und Serumentzug Stress?

Thrombin und Serumentzug bewirken eine Stressinduktion in den Endothelzellen. In beiden Fällen wird im Rahmen der Stressreaktion die NADPH-Oxidase 2 aktiviert und die Endothelzellen bilden vermehrt Sauerstoffradikale, die sogenannten ROS (Karbach et al. 2012, Li et al. 2007, Russell und Hamilton 2014). Dies führt zur Barrieredysfunktion mit Erhöhung der endothelialen Permeabilität (Boueiz und Hassoun 2009, Di et al. 2016). Eine vermehrte Bildung von ROS kann auch zur Entkopplung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) führen. ROS reagieren dann mit NO zu Peroxynitrit, welches zur Oxidation von Tetrahydrobiopterin führt. Dadurch steht dies nicht mehr für die eNOS zur Verfügung und es werden anstatt NO reaktive Sauerstoff- und Stickstoffradikale gebildet (Daiber et al. 2017, Li et al. 2013, Wenzel et al. 2007). Dies erhöht zusätzlich den oxidativen Stress auf das Endothel. Funktionell zeigt sich der Stress von Endothelmonolayern daher in einer Störung von Barrierefunktion und Angiogenese.

Der Serumentzug verursacht in den Endothelzellen einen allgemeinen Mangel an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren und induziert nicht rezeptorspezifisch zellulären Stress (Li et al. 2007, Russell und Hamilton 2014). In dieser Arbeit konnte in den funktionellen Untersuchungen nach Serumentzug eine Abnahme der Barriereintegrität als Ausdruck des endothelialen Stresses gezeigt werden.

Thrombin bewirkt spezifisch über den PAR-1 die Aktivierung von Signalkaskaden, die letztlich zu einer Störung der endothelialen Integrität führen. Die Aktivierung dieser Signalkaskaden führt wie in der Einleitung beschrieben zur Phosphorylierung der ERK und der Myosin-Leichtkettenkinase. An einem mathematischen Modell wurde gezeigt, dass das Maximum der Phosphorylierung der Myosin-Leichtkettenkinase bereits nach 2,5 min Behandlung mit Thrombin erreicht ist. Dies korreliert mit der Kontraktion der Endothelzellen und erklärt die schnell einsetzende Erhöhung der endothelialen Permeabilität (Aslam et al. 2012, Wei et al. 2011). Bestätigt wurde dies in experimentellen Untersuchungen an HUVEC, bei denen die Permeabilitätserhöhung kurz nach Beginn der Thrombinbehandlung einsetzte.

Ebenfalls konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es bereits Minuten nach Stressinduktion mit Thrombin zu einer gesteigerten Phosphorylierung der ERK und einer Abnahme der Barriereintegrität kam.

Es ist nachgewiesen, dass Thrombin die Angiogenese sowohl fördern als auch stören kann (Andrikopoulos et al. 2015, Blackburn und Brinckerhoff 2008). In niedrigen Konzentrationen induziert Thrombin über PAR-1 die Expression proangiogener Gene wie VEGF und Angiopoetin. Bei hohen Konzentrationen dagegen wird die Endothelzellfunktion durch Thrombin gestört und es kommt zur Apoptose (Blackburn und Brinckerhoff 2008, Zain et al. 2000).

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Thrombinkonzentrationen wirkten antiangiogen. Die Behandlung mit Thrombin bewirkte eine deutliche Reduktion der Kreuzungsstellen der endothelialen Tubuli.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Serumentzug als auch Thrombin eine endotheliale Dysfunktion verursachen, wie sie pathophysiologisch auch im Rahmen der Präeklampsie und der IUGR entsteht.

### **7.2.2 Welchen Effekt hat PETN *in vitro*?**

In den funktionellen Untersuchungen zeigte sich eine Stabilisierung der Endothelfunktion durch PETN.

Die Ergebnisse der Arbeit weisen eine signifikant geringere Störung der Barriereintegrität unter Stress nach Behandlung mit PETN nach. Es zeigte sich eine signifikant geringere Unterbrechung der Monolayerintegrität sowohl bei Induktion des Stresses mit Thrombin als auch nach Serumentzug. PETN bewirkte demnach eine Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion.

Die Unterbrechung der Tubuli konnte durch PETN signifikant verringert werden. Das bestätigt die These, dass PETN die angiogenetische Funktion der Endothelzellen auch unter Stress erhält.

### **7.2.3 Welche Signalkaskaden sind an der Attenuierung der Endothelzellaktivierung beteiligt?**

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es nach Behandlung mit PETN zu einer Abschwächung der Endothelzellaktivierung nachgewiesen durch den Phosphorylierungszustand der ERK kam.

Die Aktivierung der ERK spielt in mehreren zellulären Prozessen wie bei Proliferation, Differenzierung, Onkogenese und auch Apoptose eine Rolle und wird durch eine Vielzahl von Mitogenen wie Wachstumsfaktoren, Hormonen und Neurotransmittern aktiviert (Rubinfeld und Seger 2005).

Außerdem ist nachgewiesen, dass die ERK im Rahmen der durch Thrombin ausgelösten endothelialen Dysfunktion aktiviert wird und an der Erhöhung der endothelialen Permeabilität beteiligt ist (Cai 2005). Diese Störung der Integrität des Endothels ist Bestandteil der Pathogenese von Krankheitsbildern, die mit einer

Inflammation des Endothels einhergehen wie Arteriosklerose, Sepsis, IUGR und Präeklampsie (Borbiev et al. 2003, Cai 2005, Parker und Werler 2014).

Die Untersuchungen stellen nur einen Einstieg in die Analyse der beteiligten Signaltransduktionswege dar. Der Mechanismus, wie PETN die Endothelzellfunktion stabilisiert ist bisher noch nicht geklärt und wurde nicht in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Bekannt und auch in dieser Arbeit bestätigt ist, dass nach PETN-Behandlung die Expression der HO-1 erhöht ist. PETN unterliegt einer sehr schnellen Metabolisierung zu Pentaerythryltrinitrat, welches weiter zu Pentaerythryldinitrat denitriert wird. Diese Metabolite sind für die erhöhte Expression der HO-1 verantwortlich (Oberle et al. 2002, Pabst et al. 2000). Wie jedoch die gesteigerte Expression der HO-1 und die verminderte Aktivierung der ERK in Zusammenhang stehen, ist bisher nicht untersucht.

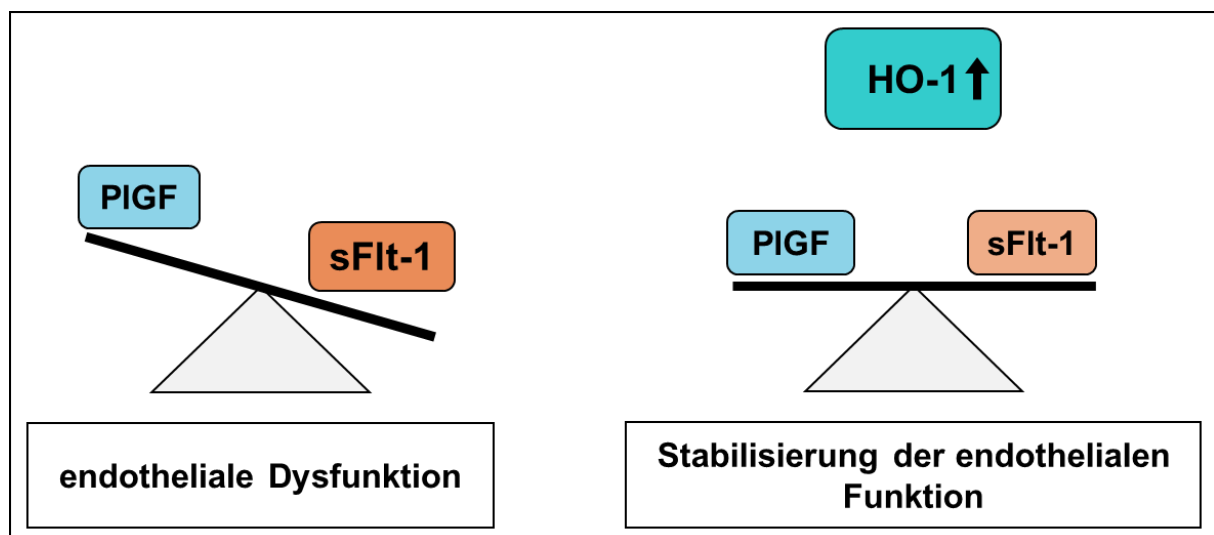
An der Aktivierung der ERK sind die verminderte Bildung von cAMP, die Aktivierung der NAPDPH-Oxidase und die gesteigerte Produktion von ROS beteiligt. Möglicherweise wird über diese Mechanismen auch die verminderte ERK-Aktivierung vermittelt. Bereits an HUVEC gezeigt wurde, dass es bei Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion zu einer Erhöhung von cAMP und einer erhöhten Aktivität der Myosin-Leichtkettenphosphatase kam. Dies wiederum bewirkt eine Relaxation der Endothelzellen und führt zu einem intakten Endothel (Aslam et al. 2012, Hippenstiel et al. 2002). Weitere Untersuchungen sind nötig um herauszufinden, wie genau eine Erhöhung der HO-1 mit der Aktivierung der ERK in Zusammenhang steht.

Im Rahmen der Erforschung der Signaltransduktionswege bei der Stressreaktion von Endothelzellen wird auch die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) untersucht. Die AMPK ist ein Regulator der Zellhomöostase und ihr Aktivierungszustand gibt ein Hinweis auf den energetischen Zustand der Zelle (Liang et al. 2017). Zur Phosphorylierung und Aktivierung der AMPK kommt es unter anderem durch Nährstoffmangel und Thrombinbehandlung (Herzig und Shaw 2018, Stahmann et al. 2006). Die aktivierte AMPK vermittelt über ihre Effektormoleküle die Reduktion von oxidativem Stress und beeinflusst Proliferation und Migration. Es wurde gezeigt,

dass nach Aktivierung der AMPK die Aktivität der NADPH-Oxidase und die Phosphorylierung der ERK gehemmt wird. Dies könnte auch eine Erklärung für die verminderte Aktivierung der ERK nach Behandlung mit PETN darstellen. Jedoch ist die Interaktion zwischen AMPK und ERK nicht vollständig geklärt und wird in der Literatur nicht einheitlich beschrieben (Chang et al. 2018, Choy et al. 2016, Liang et al. 2017, Mihaylova und Shaw 2011, Nagata et al. 2004).

#### 7.2.4 Was bewirkt die Hämoxigenase-1?

Es wurde bereits nachgewiesen, dass eine vermehrte Expression der HO-1 einen Rückgang von endothelaktivierenden Faktoren wie sFlt-1 und Endoglin verursacht (Cudmore et al. 2007). Durch die Abnahme endothelaktivierender Faktoren wird das Verhältnis von endothelaktivierenden und endothelprotektiven Faktoren zugunsten der protektiven Faktoren verändert und so die endotheliale Dysfunktion vermindert (Ahmed und Cudmore 2009, Kinderlerer et al. 2009). Dies könnte ein Aspekt sein, wie sich der in der Pilotstudie gezeigte Effekt bei Schwangeren mit Präeklampsie und IUGR erklären ließe.

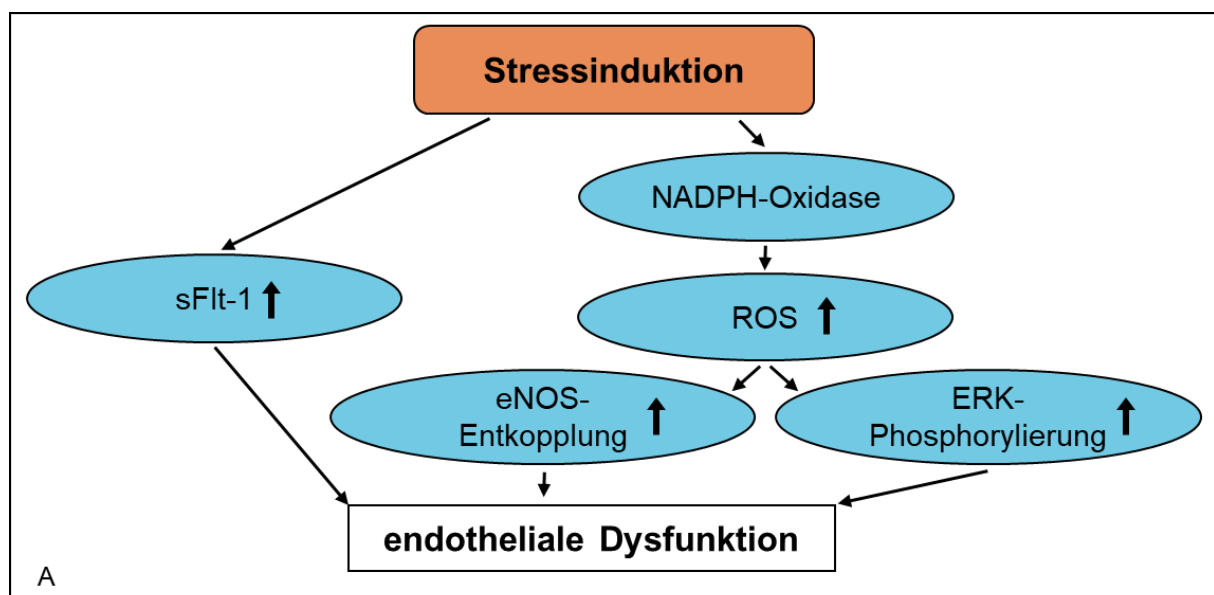


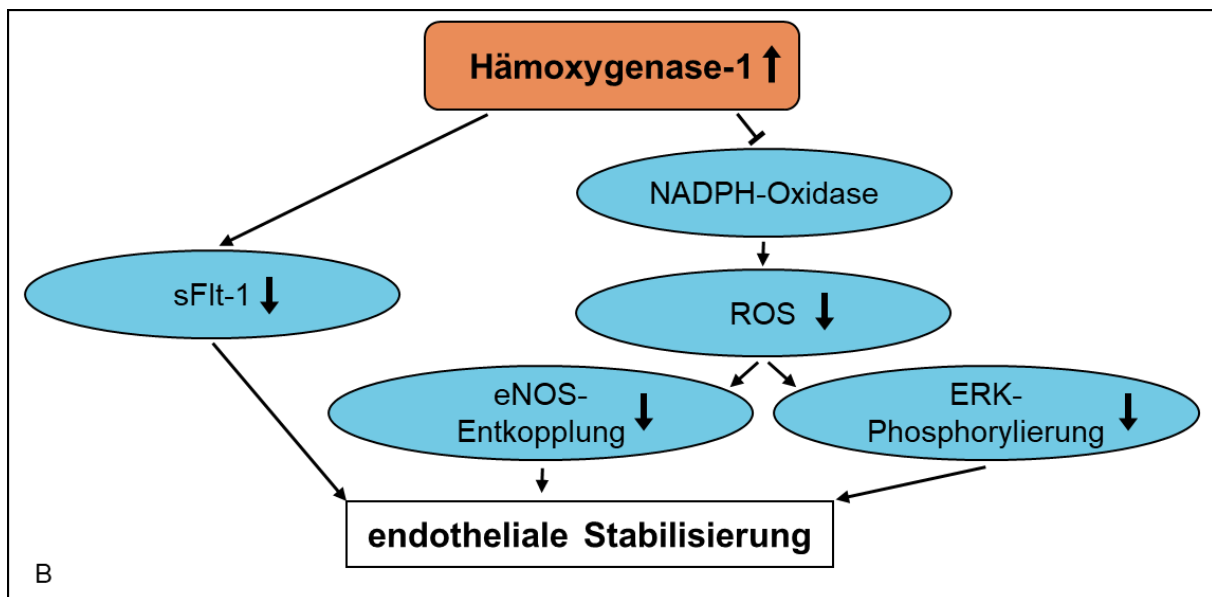
**Abbildung 25** Möglicher Mechanismus der Stabilisierung der endothelialen Dysfunktion durch die Aktivierung der Hämoxigenase-1

Die gesteigerte Expression der Hämoxigenase (HO-1) bewirkt eine Abnahme des löslichen VEGF-Rezeptors-1 (sFlt-1). Dadurch wird das Verhältnis von endothelaktivierenden und endothelprotektiven Faktoren zugunsten der protektiven Faktoren verändert und die endotheliale Dysfunktion wird abgemildert (PlGF = plazentarer Wachstumsfaktor) (modifiziert nach Ahmed und Cudmore 2009).



Des Weiteren ist gezeigt, dass die HO-1 eine Verminderung der NADPH-Oxidase-Aktivität und der Bildung von ROS bewirkt (Schuhmacher et al. 2010). Gleichzeitig hemmen beim Hämabbau entstehende antioxidativ wirkende Faktoren, insbesondere Bilirubin, ebenfalls die Aktivität der NADPH-Oxidase (Jiang et al. 2006, Kwak et al. 1991, Oberle et al. 2003). Die endotheliale NADPH-Oxidase ist eine der Hauptquellen von zellulären ROS, eine verminderte NADPH-Oxidase-Aktivität führt daher zu einer verminderten Bildung von ROS (Ago et al. 2011, Kuroda et al. 2010, Pendyala et al. 2009). Da ROS die ERK-Phosphorylierung stimulieren, wird durch eine reduzierte ROS-Bildung möglicherweise die ERK weniger stark phosphoryliert (Cai 2005, Kevil et al. 2000). Eine verminderte ROS-Bildung geht mit einer Wiederherstellung der normalen Funktion der eNOS einher und kann so zusätzlich zur Reduktion von endotheliale Stress beitragen.





**Abbildung 26 Hypothese zur Erklärung der Stabilisierung der Endothelfunktion durch die Hämoxygenase-1**

Nach Stressinduktion kommt es zur Freisetzung von löslichem VEGF-Rezeptor-1 (sFlt-1) und zur Aktivierung der NADPH-Oxidase. Die NADPH-Oxidase führt zur vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS), welche die Entkopplung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) bewirken und zur Phosphorylierung der ERK führen (A). Durch die Aktivierung der Hämoxygenase (HO-1) wird die Freisetzung von sFlt-1 reduziert und die Aktivität der NADPH-Oxidase gehemmt (Ramma und Ahmed 2014). Dadurch entstehen weniger ROS und die Entkopplung der eNOS wird reduziert. Die verminderte ROS-Bildung geht auch mit einer verminderten Phosphorylierung der ERK einher. Dies führt zur Stabilisierung der endothelialen Funktion (B).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen in Verbindung mit den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse eine Erhöhung der Resistenz der Endothelzellmonolayer *in vitro* gegenüber Stressoren durch die Zugabe von PETN. Diese Stabilisierung der Endothelfunktion lässt sich durch PETN und die gesteigerte Expression der HO-1 erklären.

#### 7.2.5 Welche endothelspezifischen Effekte von PETN sind bisher bekannt?

Wie Präeklampsie und IUGR sind auch Diabetes und Koronare Herzkrankheit (KHK) mit einer Störung der Endothelfunktion assoziiert (Cai 2005, Landmesser und Drexler 2005). Bisher wurde bei diesen Krankheitsbildern bereits untersucht, inwiefern PETN eine Stabilisierung des Endothels bewirkt.

In einer tierexperimentellen Studie wurde die Wirkung von PETN und Isosorbidmononitrat auf die endotheliale Dysfunktion und die Arteriosklerose

untersucht. Dabei führte nur die Behandlung mit PETN zu einer signifikanten Reduktion der Dysfunktion und der Ausbildung arteriosklerotischer Plaques (Kojda et al. 1995).

Schuhmacher et al. zeigten in mehreren tierexperimentellen Studien zur Wirkung von PETN eine signifikante Besserung der Endothelfunktion bei experimentell induziertem Diabetes und Angiotensin-II-induzierter endothelialer Dysfunktion. Die Endothelfunktion wurde in diesen Studien anhand der Gefäßrelaxation *ex vivo* gemessen. PETN verminderte in dieser Studie auch die Aktivität der NADPH-Oxidase und die Bildung von ROS. Auch die Entkopplung der eNOS wurde in diesen Studien durch PETN verhindert (Schuhmacher et al. 2010, Schuhmacher et al. 2011). Die Entkopplung der eNOS tritt beispielsweise bei kardiovaskulären Erkrankungen wie KHK und Diabetes auf (Ago et al. 2011, Schuhmacher et al. 2010). Bei der Präeklampsie und der IUGR wurde ebenfalls eine Fehlfunktion der eNOS festgestellt (Burke et al. 2016, Krause et al. 2011, Motta-Mejia et al. 2017). Eine Wiederherstellung der normalen Funktion der eNOS kann den endothelialen Stress bei Präeklampsie und IUGR vermindern. Schuhmacher et al. wiesen nach PETN-Behandlung ebenfalls eine vermehrte Bildung der endothelschützenden HO-1 nach, welche für die Besserung der endothelialen Dysfunktion verantwortlich gemacht wurde (Schuhmacher et al. 2010, Schuhmacher et al. 2011).

In einer klinischen Studie von Schnorbus et al. konnte durch PETN die endotheliale Dysfunktion bei Patienten mit KHK nicht verbessert werden. Im Gegensatz zu anderen Nitraten verschlechterte PETN die Endothelfunktion jedoch auch nicht. Ursache der ausbleibenden Verbesserung der Dysfunktion in der Studie von Schnorbus et al. ist möglicherweise die gleichzeitige Behandlung der Patienten mit Statinen. Auch durch Statine wird die Expression der HO-1 gesteigert und dadurch oxidativer Stress reduziert. Dieser Effekt kann in der Studie von Schnorbus et al. die Wirkung von PETN maskiert haben (Schnorbus et al. 2010).

### **7.2.6 Welche anderen das Endothel beeinflussenden Therapiestrategien sind bekannt für die Behandlung von IUGR und Präeklampsie?**

Unter der Therapie mit Statinen wird eine Reduktion von oxidativem Stress und Inflammation bei Patienten mit KHK beobachtet (Thomas et al. 2006). Statine bewirken über die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase (Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase) eine Verminderung der Cholesterinsynthese und werden hauptsächlich bei Fettstoffwechselstörungen eingesetzt. Darüber hinaus steigern Statine ebenfalls die Expression der HO-1. Cudmore et al. zeigten eine verminderte Freisetzung von sFlt-1 aus HUVEC und Plazentazottenexplantaten nach Stimulation mit VEGF und Behandlung mit Statinen (Cudmore et al. 2007).

Die Wirkung von Statinen wurde auch bei Präeklampsie im Tiermodell untersucht. Im Mausmodell zeigte sich durch Pravastatin nach Auslösen präeklampsischer Symptome mit sFlt-1 ein Rückgang von Proteinurie und Hypertonie. Außerdem wurde eine Abnahme antiangiogener Faktoren wie sFlt-1 und Endoglin beobachtet (Kumasawa et al. 2011, Saad et al. 2014). In einer klinischen Pilotstudie von Costantine et al. an Schwangeren mit hohem Risiko für eine Präeklampsie zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Pravastatin und Placebo bezüglich des Auftretens der Präeklampsie. Auch bei der Bestimmung von sFlt-1 und PIGF wurde kein Unterschied zwischen Pravastatin und Placebo festgestellt (Costantine et al. 2016). In einer weiteren klinischen Studie wird bei Patientinnen mit Präeklampsie untersucht, ob Pravastatin eine Linderung der Präeklampsie bewirkt und zu einer Änderung der Biomarker führt (Ramma und Ahmed 2014). Die Ergebnisse liegen aktuell noch nicht vor.

Statine sind während der Schwangerschaft nicht zugelassen und die Behandlung mit Statinen fand bisher keinen Eingang in die Leitlinien zur Behandlung der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen und der IUGR.

In einer multizentrischen placebokontrollierten Studie wurde nach Einnahme von ASS ein vermindertes Auftreten von Präeklampsiefällen bei Schwangeren mit erhöhtem Risiko für Präeklampsie festgestellt (Rolnik et al. 2017). ASS hemmt irreversibel die Cyclooxygenase-1 in Thrombozyten und reduziert die Synthese von Thromboxan A<sub>2</sub>.

In niedriger Dosierung wird ASS hauptsächlich als Thrombozytenaggregationshemmer bei KHK und Schlaganfall eingesetzt. Der Wirkmechanismus von ASS im Rahmen der Prophylaxe der Präeklampsie ist bisher nicht geklärt. Es wird vermutet, dass es über die Verminderung von Thromboxan A<sub>2</sub> zu einer Vasodilatation und zusammen mit der Hemmung der Thrombozytenaggregation zur Verhinderung der Präeklampsie kommt. In HUVEC verhinderte ASS die durch Tumornekrosefaktor- $\alpha$  induzierte Herabregulation der eNOS (Kim et al. 2017). Auch wurde die Wirkung von ASS auf Trophoblasten untersucht. In Zellkulturversuchen mit Trophoblasten wurde eine Erhöhung von PIGF und eine Abnahme von sFlt-1 nach Behandlung mit ASS beobachtet (Li et al. 2015, Panagodage et al. 2016). In der Leitlinie ist ASS zur Prävention von Präeklampsie bei Schwangeren mit hohem Risiko für Präeklampsie daher jetzt empfohlen, wenn die Therapie vor der 16. SSW begonnen wird (DGGG 2019). Bei der IUGR zeigte sich ein Effekt bisher nur in Subanalysen einer Metaanalyse bei Behandlungsbeginn vor der 16. SSW (Roberge et al. 2017, Tan et al. 2018). Prospektive Studien fehlen bisher.

In einer weiteren multinationalen klinischen Studie wurde der Effekt von Sildenafil auf IUGR und Präeklampsie untersucht (Ganzevoort et al. 2014). Sildenafil ist ein Phosphodiesterase-5-Inhibitor, welcher die Inaktivierung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) verhindert. In der Folge wird die Myosin-Leichtkettenphosphatase aktiviert und nach Dephosphorylierung der Myosin-Leichtkette kommt es zur Relaxation der glatten Muskulatur und zur Vasodilatation. Dies sollte eine Verbesserung der placentaren Durchblutung und der fetalen Versorgung bewirken.

In tierexperimentellen Studien und ersten klinischen Studien zur IUGR wurde eine Zunahme des placentaren und fetalen Wachstums nach Behandlung mit Sildenafil festgestellt (von Dadelszen et al. 2011, Oyston et al. 2016, Paauw et al. 2017). In klinischen Studien zur Präeklampsie zeigte sich eine Prolongation der Schwangerschaftsdauer ohne Einfluss auf die neonatale Morbidität und Mortalität (Samangaya et al. 2009, Trapani et al. 2016).

In einer internationalen klinischen Studie wurde der Effekt von Sildenafil bei Patientinnen, bei denen während der Schwangerschaft eine IUGR auftrat, untersucht.

In Großbritannien, Australien und Neuseeland zeigte sich keine Reduktion der neonatalen Morbidität und auch keine Änderung von Biomarkern wie sFlt-1 und PlGF (Sharp et al. 2018). In den Niederlanden wurde bei einer geplanten Zwischenanalyse ein gehäuftes Auftreten von neonatalen Todesfällen und pulmonaler Hypertonie bei den Neugeborenen unter der Behandlung mit Sildenafil festgestellt. Daraufhin wurde die Studie abgebrochen (Groom et al. 2019). Vom Einsatz von Sildenafil in der Schwangerschaft wird daher aktuell abgeraten.

### **7.2.7 Wie ist die Bedeutung von PETN in die bisherigen therapeutischen Strategien einzuordnen?**

ASS ist das einzige Medikament, für das bisher in einer prospektiv randomisierten Studie eine Reduktion des Auftretens der Präeklampsie gezeigt wurde, wenn mit der Behandlung im ersten Trimenon begonnen wurde. Ob und unter welchen Voraussetzungen ASS auch auf die Entwicklung der IUGR einen Effekt hat, ist bisher nicht abschließend geklärt. Es bleibt daher die Frage wie Schwangere, die erst im zweiten Trimenon mit einer unzureichenden plazentaren Perfusion auffällig werden, behandelt werden können.

In einer Pilotstudie wurde gezeigt, dass die Sekundärprophylaxe mit PETN bei Schwangerschaften mit einem pathologischen Befund in der Dopplersonographie im Rahmen der Feindiagnostik in der 20. SSW das Auftreten von IUGR reduzierte und Präeklampsien deutlich später in der Schwangerschaft auftraten (Schleussner et al. 2014). PETN ist daher das einzige weitere Medikament neben ASS, welches in placebokontrollierten, randomisierten klinischen Studien einen Effekt auf die IUGR und die Präeklampsie hatte. Im Gegensatz zu ASS wurde in der Pilotstudie mit PETN bei Feststellung des Risikos für IUGR im zweiten Trimenon eine Reduktion des Auftretens der IUGR nach Gabe von PETN gezeigt. Möglicherweise kann auch bei Versagen der Prophylaxe mit ASS eine Abmilderung der Präeklampsie und der IUGR durch PETN erreicht werden. PETN wird ebenfalls wie ASS prophylaktisch vor Auftreten von IUGR oder Präeklampsie eingesetzt, wirkt jedoch bei Feststellung der eingeschränkten Perfusion im zweiten Trimester. Im Gegensatz dazu wurde Sildenafil und wird aktuell noch Pravastatin nur zur Therapie bei bereits bestehender IUGR untersucht.

Bei den Schwangeren, die bisher mit PETN behandelt worden waren, sind keinerlei negative Folgen für Mutter oder Kind aufgetreten. In der Fachinformation zu PETN werden Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Blutdruckabfall und Flush aufgelistet. In der Pilotstudie sind in der PETN-Gruppe jedoch keine Nebenwirkungen aufgetreten. Aufgrund der deutlichen Linderung der Folgen der Plazentationsstörung und des guten Nebenwirkungsprofils von PETN eignet sich dieses Medikament zur Sekundärprophylaxe und wird in experimentellen Untersuchungen und klinischen Studien weiter erforscht.

## 8 Schlussfolgerungen und Ausblick

Präeklampsie und IUGR gehören zu den häufigsten geburtshilflichen Erkrankungen in den industrialisierten Ländern (Duley 2009, ACOG 2013, Walker 2000). Das Verständnis der Pathophysiologie ist weiterhin unvollständig und eine ursächliche Therapie existiert bisher nicht. Pathophysiologisch kommt es bei beiden Erkrankungen zu einer Plazentationsstörung und einer Dysfunktion des maternalen Endothels. In einer Pilotstudie reduzierte die Sekundärprophylaxe mit PETN das Auftreten von IUGR und perinatalem Tod und verzögerte das Auftreten der Präeklampsie bei Patientinnen mit Plazentationsstörung (Schleussner 2014).

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass PETN die Funktion endothelialer Monolayer unter Stressbedingungen signifikant stabilisiert. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass PETN *in vivo* den klinischen Effekt über die Verbesserung der Gefäßfunktion und Stabilisierung des Endothels bewirkt. Auf molekularer Ebene ist anzunehmen, dass die gesteigerte Expression der endothelschützenden HO-1 die Besserung der endothelialen Dysfunktion bewirkt und ERK-gesteuerte Reaktionen beteiligt sind. Damit gibt diese Arbeit einen Hinweis darauf, wie PETN im Management von Präeklampsie und IUGR wirken könnte.

Weitere Untersuchungen zur Bestätigung dieser Ergebnisse sind notwendig. Die Signalkaskade der ERK sollte in weiterführenden Versuchen genauer betrachtet werden. Dabei interessiert vor allem, wo PETN und die HO-1 in die Signalkaskade der Stressvermittlung eingreifen und den Endothelschutz bewirken. Ein Ansatz wäre die Messung der Aktivität der NADPH-Oxidase oder der Produktion von ROS. In dem Zusammenhang wäre es auch interessant zu untersuchen, ob es durch PETN zur Wiederherstellung der normalen Funktion der eNOS bei der Präeklampsie oder der IUGR kommt. Auch der Phosphorylierungszustand der AMPK sollte in weiteren Untersuchungen betrachtet werden, da diese durch Stress aktiviert wird und eine Interaktion mit der ERK vermutet wird. Mittels ELISA kann untersucht werden, wie sich sFlt-1, Endoglin und PlGF als Marker der Endothelfunktion durch PETN verändern, da diese in der Pathophysiologie eine wichtige Rolle spielen.



Um die Bedingungen denen *in vivo* anzunähern, sollten die hier nachgewiesenen Effekte unter Verwendung von Seren von Schwangeren mit Präeklampsie als Auslöser des endothelialen Stresses untersucht werden.

Zur Verifizierung der klinischen Ergebnisse wird aktuell eine multizentrische Studie durchgeführt. Zusammen mit den Ergebnissen, die *in vitro* gewonnen wurden, kann dies entscheidend zur Verbesserung des Managements von Präeklampsie und IUGR beitragen.

## 9 Literatur- und Quellenverzeichnis

- AceaBiosciences. 2013. Using the xCELLigence System for Functional Genomics: Assessing Gene Function in Real Time Acea Biosciences. Application Note No 11.
- AceaBiosciences. 2017. Identifying and Characterizing Endocrine Disruptors Using a Cell Panel-Based RealTime Assay. Application Note No 12.
- ACOG. 2013a. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol*, 122 (5):1122-1131.
- ACOG. 2013b. ACOG Practice bulletin no. 134: fetal growth restriction. *Obstet Gynecol*, 121 (5):1122-1133.
- Adyshev DM, Dudek SM, Moldobaeva N, Kim KM, Ma SF, Kasa A, Garcia JG, Verin AD. 2013. Ezrin/radixin/moesin proteins differentially regulate endothelial hyperpermeability after thrombin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 305 (3):L240-255.
- Ago T, Kuroda J, Kamouchi M, Sadoshima J, Kitazono T. 2011. Pathophysiological Roles of NADPH Oxidase/Nox Family Proteins in the Vascular System - Review and Perspective. *Circulation Journal*, 75 (8):1791-1800.
- Ahmed A. 2011. New insights into the etiology of preeclampsia: identification of key elusive factors for the vascular complications. *Thrombosis Research*, 127:S72-S75.
- Ahmed A, Cudmore MJ. 2009. Can the biology of VEGF and haem oxygenases help solve pre-eclampsia? *Biochem Soc Trans*, 37 (Pt 6):1237-1242.
- Andrikopoulos P, Kieswich J, Harwood SM, Baba A, Matsuda T, Barbeau O, Jones K, Eccles SA, Yaqoob MM. 2015. Endothelial Angiogenesis and Barrier Function in Response to Thrombin Require  $Ca^{2+}$  Influx through the  $Na^{+}/Ca^{2+}$  Exchanger. *J Biol Chem*, 290 (30):18412-18428.
- Aslam M, Pfeil U, Gunduz D, Rafiq A, Kummer W, Piper HM, Noll T. 2012. Intermedin (adrenomedullin2) stabilizes the endothelial barrier and antagonizes thrombin-induced barrier failure in endothelial cell monolayers. *Br J Pharmacol*, 165 (1):208-222.
- Barker DJ. 2006. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol*, 49 (2):270-283.
- Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Koblinski J. 2014. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev*, 79-80:3-18.
- Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlsson A, Golan A. 2000. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *Am J Obstet Gynecol*, 182 (1 Pt 1):198-206.

- Blackburn JS, Brinckerhoff CE. 2008. Matrix metalloproteinase-1 and thrombin differentially activate gene expression in endothelial cells via PAR-1 and promote angiogenesis. *Am J Pathol*, 173 (6):1736-1746.
- Bogatcheva NV, Garcia JG, Verin AD. 2002. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry (Mosc)*, 67 (1):75-84.
- Borbiev T, Verin AD, Birukova A, Liu F, Crow MT, Garcia JGN. 2003. Role of CaM kinase II and ERK activation in thrombin-induced endothelial cell barrier dysfunction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285 (1):L43-L54.
- Boueiz A, Hassoun PM. 2009. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc Res*, 77 (1):26-34.
- Brown MC, Best KE, Pearce MS, Waugh J, Robson SC, Bell R. 2013. Cardiovascular disease risk in women with pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol*, 28 (1):1-19.
- Burke SD, Zsengeller ZK, Khankin EV, Lo AS, Rajakumar A, DuPont JJ, McCurley A, Moss ME, Zhang D, Clark CD, Wang A, Seely EW, Kang PM, Stillman IE, Jaffe IZ, Karumanchi SA. 2016. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 promotes angiotensin II sensitivity in preeclampsia. *J Clin Invest*, 126 (7):2561-2574.
- Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC. 2009. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*, 30 (6):473-482.
- Cai H. 2005. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res*, 68 (1):26-36.
- Carpentier G. 2012. ImageJ contribution: Angiogenesis Analyzer. *ImageJ News*.
- Chang PK, Yen IC, Tsai WC, Chang TC, Lee SY. 2018. Protective Effects of *Rhodiola Crenulata* Extract on Hypoxia-Induced Endothelial Damage via Regulation of AMPK and ERK Pathways. *Int J Mol Sci*, 19 (8).
- Choy KW, Mustafa MR, Lau YS, Liu J, Murugan D, Lau CW, Wang L, Zhao L, Huang Y. 2016. Paeonol protects against endoplasmic reticulum stress-induced endothelial dysfunction via AMPK/PPARdelta signaling pathway. *Biochem Pharmacol*, 116:51-62.
- Cnossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BW, van der Post JA, Coomarasamy A, Zwinderman AH, Robson SC, Bindels PJ, Kleijnen J, Khan KS. 2008. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ*, 178 (6):701-711.
- Costantine MM, Cleary K, Hebert MF, Ahmed MS, Brown LM, Ren ZX, Easterling TR, Haas DM, Haneline LS, Caritis SN, Venkataramanan R, West H, D'Alton M, Hankins G, C EKSNI. 2016. Safety and pharmacokinetics of pravastatin used for the prevention of preeclampsia in high-risk pregnant women: a pilot randomized controlled trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 214 (6).

- Coughlin SR. 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*, 3 (8):1800-1814.
- Cudmore M, Ahmad S, Al-Ani B, Fujisawa T, Coxall H, Chudasama K, Devey LR, Wigmore SJ, Abbas A, Hewett PW, Ahmed A. 2007. Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. *Circulation*, 115 (13):1789-1797.
- Daiber A, Münzel T. 2015. Organic Nitrate Therapy, Nitrate Tolerance, and Nitrate-Induced Endothelial Dysfunction: Emphasis on Redox Biology and Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*, 23 (11):899-942.
- Daiber A, Wenzel P, Oelze M, Munzel T. 2008. New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. *Clin Res Cardiol*, 97 (1):12-20.
- Daiber A, Oelze M, Wenzel P, Bollmann F, Pautz A, Kleinert H. 2012. Heme oxygenase-1 induction and organic nitrate therapy: beneficial effects on endothelial dysfunction, nitrate tolerance, and vascular oxidative stress. *Int J Hypertens*, 2012:842632.
- Daiber A, Di Lisa F, Oelze M, Kroller-Schon S, Steven S, Schulz E, Munzel T. 2017. Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function. *Br J Pharmacol*, 174 (12):1670-1689.
- Davis EF, Newton L, Lewandowski AJ, Lazdam M, Kelly BA, Kyriakou T, Leeson P. 2012. Pre-eclampsia and offspring cardiovascular health: mechanistic insights from experimental studies. *Clin Sci (Lond)*, 123 (2):53-72.
- Davis GE, Camarillo CW. 1996. An alpha 2 beta 1 integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix. *Exp Cell Res*, 224 (1):39-51.
- Davis GE, Senger DR. 2008. Extracellular matrix mediates a molecular balance between vascular morphogenesis and regression. *Curr Opin Hematol*, 15 (3):197-203.
- DeCicco-Skinner KL, Henry GH, Cataisson C, Tabib T, Gwilliam JC, Watson NJ, Bullwinkle EM, Falkenburg L, O'Neill RC, Morin A, Wiest JS. 2014. Endothelial Cell Tube Formation Assay for the In Vitro Study of Angiogenesis. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, (91).
- Dejana E. 2004. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5 (4):261-270.
- DGGG. 2019. Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen: Diagnose und Therapie. AWMF Registry No 015/018, S2k-Level.
- Di A, Mehta D, Malik AB. 2016. ROS-activated calcium signaling mechanisms regulating endothelial barrier function. *Cell Calcium*, 60 (3):163-171.
- Dragoni S, Gori T, Lisi M, Di Stolfo G, Pautz A, Kleinert H, Parker JD. 2007. Pentaerythrityl tetranitrate and nitroglycerin, but not isosorbide mononitrate,

- prevent endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27 (9):1955-1959.
- Duley L. 2009. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*, 33 (3):130-137.
- Fitzgerald KA, Malhotra M, Curtin CM, FJ OB, CM OD. 2015. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. *J Control Release*, 215:39-54.
- Ganzevoort W, Alfievic Z, von Dadelszen P, Kenny L, Papageorgiou A, van Wassenaer-Leemhuis A, Gluud C, Mol BW, Baker PN. 2014. STRIDER: Sildenafil Therapy In Dismal prognosis Early-onset intrauterine growth Restriction--a protocol for a systematic review with individual participant data and aggregate data meta-analysis and trial sequential analysis. *Syst Rev*, 3:23.
- George EM, Warrington JP, Spradley FT, Palei AC, Granger JP. 2014. The heme oxygenases: important regulators of pregnancy and preeclampsia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 307 (7):R769-777.
- Goulopoulou S, Davidge ST. 2015. Molecular mechanisms of maternal vascular dysfunction in preeclampsia. *Trends Mol Med*, 21 (2):88-97.
- Grant DS, Tashiro K, Segui-Real B, Yamada Y, Martin GR, Kleinman HK. 1989. Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell*, 58 (5):933-943.
- Groom KM, McCowan LM, Mackay LK, Lee AC, Gardener G, Unterscheider J, Sekar R, Dickinson JE, Muller P, Reid RA, Watson D, Welsh A, Marlow J, Walker SP, Hyett J, Morris J, Stone PR, Baker PN. 2019. STRIDER NZAus: a multicentre randomised controlled trial of sildenafil therapy in early-onset fetal growth restriction. *BJOG*, 126 (8):997-1006.
- Groten T. 2014. Untersuchungen zur endothelialen und trophoblastären Dysfunktion bei der Präeklampsie unter besonderer Berücksichtigung der Cadherine und ihrer Funktion für die endotheliale Hormöostase [Habilitation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Herzig S, Shaw RJ. 2018. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19 (2):121-135.
- Higashi Y, Maruhashi T, Noma K, Kihara Y. 2014. Oxidative stress and endothelial dysfunction: clinical evidence and therapeutic implications. *Trends Cardiovasc Med*, 24 (4):165-169.
- Hippenstiel S, Witzenrath M, Schmeck B, Hocke A, Krisp M, Krull M, Seybold J, Seeger W, Rascher W, Schutte H, Suttorp N. 2002. Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ Res*, 91 (7):618-625.
- Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. 2010. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*, 10 (9):1886-1890.
- Huppertz B. 2008. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension*, 51 (4):970-975.
- Huppertz B, Schleußner E. 2018. Die Plazenta Grundlagen und klinische Bedeutung. Edition Aufl.

- James JL, Carter AM, Chamley LW. 2012. Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? *Placenta*, 33 (5):327-334.
- Jayet PY, Rimoldi SF, Stuber T, Salmon CS, Hutter D, Rexhaj E, Thalmann S, Schwab M, Turini P, Sartori-Cucchia C, Nicod P, Villena M, Allemann Y, Scherrer U, Sartori C. 2010. Pulmonary and systemic vascular dysfunction in young offspring of mothers with preeclampsia. *Circulation*, 122 (5):488-494.
- Jeffers A, Owens S, Koenig K, Quaid B, Pendurthi UR, Rao VM, Idell S, Tucker TA. 2015. Thrombin down-regulates tissue factor pathway inhibitor expression in a PI3K/nuclear factor-kappaB-dependent manner in human pleural mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 52 (6):674-682.
- Jia XY, Xu J, Gu Y, Gu X, Li WM, Wang YP. 2017. Vitamin D suppresses oxidative stress-induced microparticle release by human umbilical vein endothelial cells. *Biology of Reproduction*, 96 (1):199-210.
- Jiang F, Roberts SJ, Datla, Sr., Dusting GJ. 2006. NO modulates NADPH oxidase function via heme oxygenase-1 in human endothelial cells. *Hypertension*, 48 (5):950-957.
- Kanaka-Gantenbein C, Mastorakos G, Chrousos GP. 2003. Endocrine-related causes and consequences of intrauterine growth retardation. *Ann N Y Acad Sci*, 997:150-157.
- Karbach S, Jansen T, Horke S, Heeren T, Scholz A, Coldewey M, Karpi A, Hausding M, Kroller-Schon S, Oelze M, Munzel T, Daiber A. 2012. Hyperglycemia and oxidative stress in cultured endothelial cells--a comparison of primary endothelial cells with an immortalized endothelial cell line. *J Diabetes Complications*, 26 (3):155-162.
- Kasa A, Czikora I, Verin AD, Gergely P, Csontos C. 2013. Protein phosphatase 2A activity is required for functional adherent junctions in endothelial cells. *Microvasc Res*, 89:86-94.
- Kevil CG, Oshima T, Alexander B, Coe LL, Alexander JS. 2000. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated permeability: role of MAPK and occludin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279 (1):C21-30.
- Kim J, Lee KS, Kim JH, Lee DK, Park M, Choi S, Park W, Kim S, Choi YK, Hwang JY, Choe J, Won MH, Jeoung D, Lee H, Ryoo S, Ha KS, Kwon YG, Kim YM. 2017. Aspirin prevents TNF-alpha-induced endothelial cell dysfunction by regulating the NF-kappaB-dependent miR-155/eNOS pathway: Role of a miR-155/eNOS axis in preeclampsia. *Free Radic Biol Med*, 104:185-198.
- Kinderlerer AR, Pombo Gregoire I, Hamdulay SS, Ali F, Steinberg R, Silva G, Ali N, Wang B, Haskard DO, Soares MP, Mason JC. 2009. Heme oxygenase-1 expression enhances vascular endothelial resistance to complement-mediated injury through induction of decay-accelerating factor: a role for increased bilirubin and ferritin. *Blood*, 113 (7):1598-1607.
- Kleinman HK, Martin GR. 2005. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*, 15 (5):378-386.

- Kojda G, Stein D, Kottenberg E, Schnaith EM, Noack E. 1995. In vivo effects of pentaerythrityl-tetranitrate and isosorbide-5-mononitrate on the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction in cholesterol-fed rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol*, 25 (5):763-773.
- Konstantoulaki M, Kouklis P, Malik AB. 2003. Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and beta-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285 (2):L434-442.
- Krause BJ, Hanson MA, Casanello P. 2011. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta*, 32 (11):797-805.
- Kumasawa K, Ikawa M, Kidoya H, Hasuwa H, Saito-Fujita T, Morioka Y, Takakura N, Kimura T, Okabe M. 2011. Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (4):1451-1455.
- Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai PY, Schneider MD, Sadoshima J. 2010. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (35):15565-15570.
- Kustermann S, Manigold T, Ploix C, Skubatz M, Heckel T, Hinton H, Weiser T, Singer T, Suter L, Roth A. 2014. A real-time impedance-based screening assay for drug-induced vascular leakage. *Toxicol Sci*, 138 (2):333-343.
- Kwak JY, Takeshige K, Cheung BS, Minakami S. 1991. Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system. *Biochim Biophys Acta*, 1076 (3):369-373.
- LaMarca HL, Ott CM, Honer Zu Bentrup K, Leblanc CL, Pierson DL, Nelson AB, Scandurro AB, Whitley GS, Nickerson CA, Morris CA. 2005. Three-dimensional growth of extravillous cytotrophoblasts promotes differentiation and invasion. *Placenta*, 26 (10):709-720.
- Landmesser U, Drexler H. 2005. The clinical significance of endothelial dysfunction. *Curr Opin Cardiol*, 20 (6):547-551.
- Lei J, Peng S, Samuel SB, Zhang S, Wu Y, Wang P, Li YF, Liu H. 2016. A simple and biosafe method for isolation of human umbilical vein endothelial cells. *Anal Biochem*, 508:15-18.
- Li C, Raikwar NS, Santillan MK, Santillan DA, Thomas CP. 2015. Aspirin inhibits expression of sFLT1 from human cytotrophoblasts induced by hypoxia, via cyclo-oxygenase 1. *Placenta*, 36 (4):446-453.
- Li H, Horke S, Forstermann U. 2013. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends Pharmacol Sci*, 34 (6):313-319.
- Li JM, Fan LM, George VT, Brooks G. 2007. Nox2 regulates endothelial cell cycle arrest and apoptosis via p21cip1 and p53. *Free Radic Biol Med*, 43 (6):976-986.
- Liang Y, Li J, Lin Q, Huang P, Zhang L, Wu W, Ma Y. 2017. Research Progress on Signaling Pathway-Associated Oxidative Stress in Endothelial Cells. *Oxid Med Cell Longev*, 2017:7156941.

- Lisonkova S, Joseph KS. 2013. Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease. *Am J Obstet Gynecol*, 209 (6):544 e541-544 e512.
- Liu F, Verin AD, Borbiev T, Garcia JG. 2001. Role of cAMP-dependent protein kinase A activity in endothelial cell cytoskeleton rearrangement. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280 (6):L1309-1317.
- Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*, 53 (2):245-282.
- Manning BD, Cantley LC. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129 (7):1261-1274.
- Mehta D, Malik AB. 2006. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*, 86 (1):279-367.
- Melchiorre K, Sutherland GR, Liberati M, Thilaganathan B. 2012. Maternal cardiovascular impairment in pregnancies complicated by severe fetal growth restriction. *Hypertension*, 60 (2):437-443.
- Mihaylova MM, Shaw RJ. 2011. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*, 13 (9):1016-1023.
- Moore KL, Persaud TVN, Viebahn C. 2007. Embryologie Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogenese, Klinik. 5. Aufl. Aufl. München: Elsevier.
- Motta-Mejia C, Kandzija N, Zhang W, Mhlomi V, Cerdeira AS, Burdujan A, Tannetta D, Dragovic R, Sargent IL, Redman CW, Kishore U, Vatish M. 2017. Placental Vesicles Carry Active Endothelial Nitric Oxide Synthase and Their Activity is Reduced in Preeclampsia. *Hypertension*, 70 (2):372-381.
- Multhaupt A, Huppertz B, Gohner C, Bohringer M, Mai M, Markert U, Schleussner E, Groten T. 2018. N-cadherin knockdown leads to disruption of trophoblastic and endothelial cell interaction in a 3D cell culture model - New insights in trophoblast invasion failure. *Cell Adhesion & Migration*, 12 (3):259-270.
- Nagata D, Takeda R, Sata M, Satonaka H, Suzuki E, Nagano T, Hirata Y. 2004. AMP-activated protein kinase inhibits angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*, 110 (4):444-451.
- Ness RB, Sibai BM. 2006. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 195 (1):40-49.
- Oberle S, Abate A, Grosser N, Vreman HJ, Dennery PA, Schneider HT, Stalleicken D, Schroder H. 2002. Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of pentaerythrityl trinitrate. *Biochem Biophys Res Commun*, 290 (5):1539-1544.
- Oberle S, Abate A, Grosser N, Hemmerle A, Vreman HJ, Dennery PA, Schneider HT, Stalleicken D, Schröder H. 2003. Endothelial Protection by Pentaerythrityl Trinitrate: Bilirubin and Carbon Monoxide as Possible Mediators. *Experimental Biology and Medicine*, 228 (5):529-534.



- Ogawa A, Firth AL, Ariyasu S, Yamadori I, Matsubara H, Song S, Fraidenburg DR, Yuan JX. 2013. Thrombin-mediated activation of Akt signaling contributes to pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Physiol Rep*, 1 (7):e00190.
- Oppermann M, Balz V, Adams V, Dao VT, Bas M, Suvorava T, Kojda G. 2009. Pharmacological induction of vascular extracellular superoxide dismutase expression in vivo. *J Cell Mol Med*, 13 (7):1271-1278.
- Oyston C, Stanley JL, Oliver MH, Bloomfield FH, Baker PN. 2016. Maternal Administration of Sildenafil Citrate Alters Fetal and Placental Growth and Fetal-Placental Vascular Resistance in the Growth-Restricted Ovine Fetus. *Hypertension*, 68 (3):760-767.
- Paauw ND, Terstappen F, Ganzevoort W, Joles JA, Gremmels H, Lely AT. 2017. Sildenafil During Pregnancy: A Preclinical Meta-Analysis on Fetal Growth and Maternal Blood Pressure. *Hypertension*, 70 (5):998-1006.
- Pabst G, Waitzinger J, Schmid B. 2000. Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von Pentaerithrityldi- und Mononitrat nach oraler Gabe von Pentaerithrityltetranitrat. In: Mutschler E, Schneider D, Stalleicken D, Hrsg. Pentaerithrityltetranitrat: NO-Substitution als pharmakologisch begründetes Therapieprinzip. Heidelberg: Steinkopff, 27-34.
- Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8 (10):839-845.
- Panagodage S, Yong HE, Da Silva Costa F, Borg AJ, Kalionis B, Brennecke SP, Murthi P. 2016. Low-Dose Acetylsalicylic Acid Treatment Modulates the Production of Cytokines and Improves Trophoblast Function in an in Vitro Model of Early-Onset Preeclampsia. *Am J Pathol*, 186 (12):3217-3224.
- Parker SE, Werler MM. 2014. Epidemiology of ischemic placental disease: a focus on preterm gestations. *Semin Perinatol*, 38 (3):133-138.
- Pautz A, Rauschkolb P, Schmidt N, Art J, Oelze M, Wenzel P, Forstermann U, Daiber A, Kleinert H. 2009. Effects of nitroglycerin or pentaerithrityl tetranitrate treatment on the gene expression in rat hearts: evidence for cardiotoxic and cardioprotective effects. *Physiol Genomics*, 38 (2):176-185.
- Pendyala S, Usatyuk PV, Gorshkova IA, Garcia JGN, Natarajan V. 2009. Regulation of NADPH Oxidase in Vascular Endothelium: The Role of Phospholipases, Protein Kinases, and Cytoskeletal Proteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11 (4):841-860.
- Peters K, Kamp G, Berz A, Unger RE, Barth S, Salamon A, Rychly J, Kirkpatrick CJ. 2009. Changes in Human Endothelial Cell Energy Metabolic Capacities during in vitro Cultivation. The Role of "Aerobic Glycolysis" and Proliferation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 24 (5-6):483-492.
- Polte T, Abate A, Dennery PA, Schroder H. 2000. Heme oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20 (5):1209-1215.

- Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. 2011. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*, 123 (24):2856-2869.
- Ramma W, Ahmed A. 2014. Therapeutic potential of statins and the induction of heme oxygenase-1 in preeclampsia. *J Reprod Immunol*, 101-102:153-160.
- Redman CW, Sargent IL, Staff AC. 2014. IFPA Senior Award Lecture: making sense of pre-eclampsia - two placental causes of preeclampsia? *Placenta*, 35 Suppl:S20-25.
- Roberge S, Nicolaides K, Demers S, Hyett J, Chaillet N, Bujold E. 2017. The role of aspirin dose on the prevention of preeclampsia and fetal growth restriction: systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*, 216 (2):110-120 e116.
- Roberts JM, Hubel CA. 2009. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta*, 30 Suppl A:S32-37.
- Rolnik DL, Wright D, Poon LC, O'Gorman N, Syngelaki A, de Paco Matallana C, Akolekar R, Cicero S, Janga D, Singh M, Molina FS, Persico N, Jani JC, Plasencia W, Papaioannou G, Tenenbaum-Gavish K, Meiri H, Gizurarson S, Maclagan K, Nicolaides KH. 2017. Aspirin versus Placebo in Pregnancies at High Risk for Preterm Preeclampsia. *N Engl J Med*, 377 (7):613-622.
- Rosenberg A. 2008. The IUGR newborn. *Semin Perinatol*, 32 (3):219-224.
- Rubinfeld H, Seger R. 2005. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol*, 31 (2):151-174.
- Russell FD, Hamilton KD. 2014. Nutrient deprivation increases vulnerability of endothelial cells to proinflammatory insults. *Free Radic Biol Med*, 67:408-415.
- Saad AF, Kechichian T, Yin H, Sbrana E, Longo M, Wen M, Tamayo E, Hankins GD, Saade GR, Costantine MM. 2014. Effects of pravastatin on angiogenic and placental hypoxic imbalance in a mouse model of preeclampsia. *Reprod Sci*, 21 (1):138-145.
- Sadler TW, Langman J. 2008. *Medizinische Embryologie die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen*. Elfte Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Samangaya RA, Mires G, Shennan A, Skillern L, Howe D, McLeod A, Baker PN. 2009. A randomised, double-blinded, placebo-controlled study of the phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil for the treatment of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 28 (4):369-382.
- Schleussner E, Lehmann T, Kahler C, Schneider U, Schlembach D, Groten T. 2014. Impact of the nitric oxide-donor pentaerythryl-tetranitrate on perinatal outcome in risk pregnancies: a prospective, randomized, double-blinded trial. *J Perinat Med*, 42 (4):507-514.
- Schmitz S. 2011. *Der Experimentator: Zellkultur*. Dritte Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Schneider H, Husslein P, Schneider K-TM. 2016. *Die Geburtshilfe*. Fünfte Aufl. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin.

- Schnorbus B, Schiewe R, Ostad MA, Medler C, Wachtlin D, Wenzel P, Daiber A, Munzel T, Warnholtz A. 2010. Effects of pentaerythritol tetranitrate on endothelial function in coronary artery disease: results of the PENTA study. *Clin Res Cardiol*, 99 (2):115-124.
- Schuhmacher S, Oelze M, Bollmann F, Kleinert H, Otto C, Heeren T, Steven S, Hausding M, Knorr M, Pautz A, Reifenberg K, Schulz E, Gori T, Wenzel P, Munzel T, Daiber A. 2011. Vascular dysfunction in experimental diabetes is improved by pentaerythritol tetranitrate but not isosorbide-5-mononitrate therapy. *Diabetes*, 60 (10):2608-2616.
- Schuhmacher S, Wenzel P, Schulz E, Oelze M, Mang C, Kamuf J, Gori T, Jansen T, Knorr M, Karbach S, Hortmann M, Mathner F, Bhatnagar A, Forstermann U, Li H, Munzel T, Daiber A. 2010. Pentaerythritol tetranitrate improves angiotensin II-induced vascular dysfunction via induction of heme oxygenase-1. *Hypertension*, 55 (4):897-904.
- Sharp A, Cornforth C, Jackson R, Harrold J, Turner MA, Kenny LC, Baker PN, Johnstone ED, Khalil A, von Dadelszen P, Papageorgiou AT, Alfirevic Z, group S. 2018. Maternal sildenafil for severe fetal growth restriction (STRIDER): a multicentre, randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Lancet Child Adolesc Health*, 2 (2):93-102.
- Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturczak N, Agarwal A. 2004. The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286 (3):F425-441.
- Sipos PI, Bourque SL, Hubel CA, Baker PN, Sibley CP, Davidge ST, Crocker IP. 2013. Endothelial colony-forming cells derived from pregnancies complicated by intrauterine growth restriction are fewer and have reduced vasculogenic capacity. *J Clin Endocrinol Metab*, 98 (12):4953-4960.
- Smith GC, Pell JP, Walsh D. 2001. Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births. *Lancet*, 357 (9273):2002-2006.
- Stahmann N, Woods A, Carling D, Heller R. 2006. Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *Mol Cell Biol*, 26 (16):5933-5945.
- Stegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. 2010. Pre-eclampsia. *Lancet*, 376 (9741):631-644.
- Tan MY, Poon LC, Rolnik DL, Syngelaki A, de Paco Matallana C, Akolekar R, Cicero S, Janga D, Singh M, Molina FS, Persico N, Jani JC, Plasencia W, Greco E, Papaioannou G, Wright D, Nicolaides KH. 2018. Prediction and prevention of small-for-gestational-age neonates: evidence from SPREE and ASPRE. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 52 (1):52-59.
- Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, Fisher SJ, North RA. 2003. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*, 188 (1):177-182.

- Thomas MK, Narang D, Lakshmy R, Gupta R, Naik N, Maulik SK. 2006. Correlation between inflammation and oxidative stress in normocholesterolemic coronary artery disease patients 'on' and 'off' atorvastatin for short time intervals. *Cardiovasc Drugs Ther*, 20 (1):37-44.
- Trapani A, Jr., Goncalves LF, Trapani TF, Vieira S, Pires M, Pires MM. 2016. Perinatal and Hemodynamic Evaluation of Sildenafil Citrate for Preeclampsia Treatment: A Randomized Controlled Trial. *Obstet Gynecol*, 128 (2):253-259.
- von Beckerath AK, Kollmann M, Rotky-Fast C, Karpf E, Lang U, Klaritsch P. 2013. Perinatal complications and long-term neurodevelopmental outcome of infants with intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*, 208 (2):130 e131-136.
- von Dadelszen P, Dwinnell S, Magee LA, Carleton BC, Gruslin A, Lee B, Lim KI, Liston RM, Miller SP, Rurak D, Sherlock RL, Skoll MA, Wareing MM, Baker PN, Research into Advanced Fetal D, Therapy G. 2011. Sildenafil citrate therapy for severe early-onset intrauterine growth restriction. *BJOG*, 118 (5):624-628.
- von Versen-Hoynck F, Brodowski L, Dechend R, Myerski AC, Hubel CA. 2014. Vitamin D antagonizes negative effects of preeclampsia on fetal endothelial colony forming cell number and function. *PLoS One*, 9 (6):e98990.
- Ward AO, Caputo M, Angelini GD, George SJ, Zakkar M. 2017. Activation and inflammation of the venous endothelium in vein graft disease. *Atherosclerosis*, 265:266-274.
- Wei XN, Han BC, Zhang JX, Liu XH, Tan CY, Jiang YY, Low BC, Tidor B, Chen YZ. 2011. An integrated mathematical model of thrombin-, histamine- and VEGF-mediated signalling in endothelial permeability. *BMC Syst Biol*, 5:112.
- Weiss G, Sundl M, Glasner A, Huppertz B, Moser G. 2016. The trophoblast plug during early pregnancy: a deeper insight. *Histochem Cell Biol*, 146 (6):749-756.
- Wenzel P, Oelze M, Coldewey M, Hortmann M, Seeling A, Hink U, Mollnau H, Stalleicken D, Weiner H, Lehmann J, Li H, Forstermann U, Munzel T, Daiber A. 2007. Heme oxygenase-1: a novel key player in the development of tolerance in response to organic nitrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27 (8):1729-1735.
- Weyerstahl T, Stauber M, Andergassen U, Beham A, Bergauer F, Brucker C, Dathe O, Dautzenberg DG, Debus G, Dimpfl T, Genzel-Boroviczény O, Grubert T, Günthner-Biller MM, Hepp F, Hinrichsen M, Hütter SA, Kästner R, Kainer F, Klosterhalfen T, Maaßen V, Peschers U, Pietschmann D, Schramm T, Schuhmacher I, Staiger HF, Stauber M, Steldinger R, Stumpfe M, Teschner A, Weissenbacher TM, Zumbusch-Weyerstahl S, Wunderer G. 2013. Gynäkologie und Geburtshilfe. Duale Reihe. Vierte Aufl. Stuttgart: Thieme, 444.
- Xie L, Chiang ET, Wu X, Kelly GT, Kanteti P, Singleton PA, Camp SM, Zhou T, Dudek SM, Natarajan V, Wang T, Black SM, Garcia JG, Jacobson JR. 2016. Regulation of Thrombin-Induced Lung Endothelial Cell Barrier Disruption by Protein Kinase C Delta. *PLoS One*, 11 (7):e0158865.

- Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S. 1999. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest*, 103 (1):129-135.
- Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA. 2010. Pathogenesis of preeclampsia. *Annu Rev Pathol*, 5:173-192.
- Zain J, Huang YQ, Feng XS, Nierodzik ML, Li JJ, Karpatkin S. 2000. Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells. *Blood*, 95 (10):3133-3138.

## 10 Anhang

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Aufbau der reifen Plazenta .....	4
Abbildung 2	Reguläre Plazentation .....	5
Abbildung 3	Störung der Plazentation .....	6
Abbildung 4	Endotheliale Dysfunktion bei Präeklampsie .....	8
Abbildung 5	Aktivierung der Hämoxxygenase-1 durch Pentaerythrityltetranitrat...	13
Abbildung 6	Phosphorylierung der ERK durch Thrombin .....	15
Abbildung 7	Experimenteller Ansatz .....	27
Abbildung 8	Expression der Hämoxxygenase-1 nach Stimulation der Endothelzellen mit Pentaerythrityltetranitrat 5 $\mu$ M und 50 $\mu$ M über 24 h.....	30
Abbildung 9	Beispielhafte Darstellung der Auswertung der Western Blots .....	35
Abbildung 10	Änderung der Impedanz in Abhängigkeit von Zelladhäsion und Zellstress .....	37
Abbildung 11	Proliferation der HUVEC über 48 h .....	38
Abbildung 12	Schema zur Durchführung der Behandlung im xCELLigence®-System .....	39
Abbildung 13	Schema zur Analyse der Fluoreszenzbilder .....	42
Abbildung 14	Endotheliale Tubuli vor und nach Behandlung mit Thrombin .....	43
Abbildung 15	Phosphorylierung der ERK in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit Thrombin .....	45
Abbildung 16	Dosisabhängige Phosphorylierung der Akt nach Stimulation mit Thrombin .....	46
Abbildung 17	Desintegration des endothelialen Monolayers nach Behandlung mit Thrombin 10 U/ml über 10 min .....	47

Abbildung 18	Abfall des normalisierten Zellindex nach Serumentzug und Behandlung mit Thrombin .....	48
Abbildung 19	Reduktion der Kreuzungsstellen der Tubuli nach Serumentzug und Behandlung mit Thrombin .....	49
Abbildung 20	Abfall des normalisierten Zellindex nach Serumentzug in Abhängigkeit von PETN.....	50
Abbildung 21	Abfall des normalisierten Zellindex durch Behandlung mit Thrombin in Abhängigkeit von PETN .....	51
Abbildung 22	Reduktion der Kreuzungsstellen durch Thrombin in Abhängigkeit von PETN.....	53
Abbildung 23	Expression der ERK und P-ERK nach Vorbehandlung mit PETN 50 $\mu$ M über 24 h und anschließender Stimulation mit Thrombin 10 U/ml für 2 min .....	54
Abbildung 24	Expression der ERK und P-ERK nach Stimulation mit PETN 50 $\mu$ M über 24 h und anschließender Behandlung mit Thrombin 10 U/ml für 10 min .....	55
Abbildung 25	Möglicher Mechanismus der Stabilisierung der endothelialen Dysfunktion durch die Aktivierung der Hämoxigenase-1 .....	66
Abbildung 26	Hypothese zur Erklärung der Stabilisierung der Endothelfunktion durch die Hämoxigenase-1.....	68

## 10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Geräte und Software .....	18
Tabelle 2	Verbrauchsmaterialien .....	20
Tabelle 3	Chemikalien, Reagenzien, Enzyme.....	21
Tabelle 4	Antikörper .....	24
Tabelle 5	Kits .....	24

Tabelle 6	Verwendete Zelllinie und Medium .....	26
Tabelle 7	Verwendete Thrombinkonzentrationen und Behandlungszeiten .....	31
Tabelle 8	Beispielrechnung zur Auswertung der Angiogenese-Assays .....	44
Tabelle 9	Effekt von PETN auf die durch Serumentzug induzierte Störung der Barriereintegrität.....	50
Tabelle 10	Effekt von PETN auf die durch Thrombin induzierte Störung der Barriereintegrität.....	51
Tabelle 11	Effekt von PETN auf die durch Thrombin induzierte Reduktion der Kreuzungsstellen.....	53



### 10.3 Danksagung

Vorangestellt sei der außerordentliche Dank an meine Doktormutter Frau PD Dr. med. Tanja Groten für dieses spannende Promotionsthema und die kontinuierliche und gute Begleitung meiner Dissertation. Ich danke ihr für die Zeit, die sie in unsere zahlreichen Gespräche investiert hat, die Unterstützung und die kritische Betrachtung meiner Arbeit. Sie stand mir jederzeit beratend zur Seite und ihre Hinweise sowohl zur Planung und Durchführung der Experimente als auch zur Fertigstellung des Manuskriptes waren hilfreich und wertvoll für Durchführung dieser Dissertation.

Frau Dr. Groten war mir immer Motivation und Vorbild in der wissenschaftlichen Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. Udo Markert danke ich für die Möglichkeit in seinem Labor forschen zu dürfen. Dabei danke ich auch dem gesamten Team des Placenta-Labors für die Unterstützung bei experimentellen Herausforderungen, die zahlreichen Diskussionen und die entstandenen Freundschaften. Durch den offenen und freundschaftlichen Umgang im Team fühlte ich mich von Anfang an gut aufgenommen.

Ebenfalls danke ich Herrn Dr. rer. pol. Thomas Lehmann für die freundliche und verständnisvolle Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Meiner Familie insbesondere meinen Eltern danke ich für die stete Unterstützung während meines Studiums. Ich danke meinen Eltern dafür, dass sie mich und meine Entscheidungen stets liebevoll unterstützen und mir immer zur Seite stehen.

## **10.4 Lebenslauf**

## **10.5 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. Tanja Groten und Dr. rer. pol. Thomas Lehmann bei der statistischen Analyse der erworbenen Daten,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 26.08.2019

Veronika Teichert